# Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária

Ana Lúcia Girello
Telma Ingrid B. de Bellis Kühn

EDITORA senac SÃO PAULO

# Bases imuno-hematológicas

1

Imuno-hematologia eritrocitária é uma disciplina complexa e está relacionada a outras ciências biológicas, como imunologia, hematologia, genética, biologia molecular e bioquímica.

Neste capítulo, traremos algumas noções de imunologia, importantes para a compreensão de aspectos práticos da rotina em imuno-hematologia eritrocitária. No capítulo 2, abordaremos princípios de genética básica e molecular.

## Introdução à imunologia

Imunologia. É o estudo da imunidade, em seu sentido mais amplo, e dos eventos celulares e moleculares depois que um organismo encontra micróbios ou outras macromoléculas estranhas.

Imunidade. Deriva da palavra latina *immunitas,* ou, literalmente, isenção de vários deveres cívicos e de processos legais oferecida aos senadores romanos durante seu mandato.

Significa, mais amplamente, proteção contra doenças. É a reação a substâncias estranhas, inclusive micróbios, bem como a macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos, sem contudo implicar conseqüência fisiológica

ou patológica de tal reação. Os responsáveis pela imunidade são células e moléculas que formam o sistema imune.[1]

## Sistema imune

A proteção do indivíduo contra substâncias consideradas estranhas a ele pode ser efetuada de duas maneiras:

a) Imunidade natural ou inata: pode ser definida como uma limitada capacidade de distinguir um agente invasor de outro, e agindo quase do mesmo modo contra a maioria dos agentes infecciosos. É característica dos animais inferiores e permanece nos animais superiores. Realizada por células fagocitárias (monócitos, macrófagos, neutrófilos), proteínas plasmáticas (principalmente as do sistema complemento) e as barreiras físicas e químicas, como o epitélio e as substâncias antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais. Essa ação não depende do antígeno, e é imediata e não-específica, não ocorrendo surgimento de células de memória imunológica.

b) Imunidade adquirida ou específica: exclusiva dos animais superiores, ocorre por estimulação do sistema imune por uma substância reconhecida como não-própria (*non-self*) ao organismo (denominada antígeno), que consegue atravessar as barreiras de entrada. Por meio desta, o indivíduo imunizado passa a ter um papel ativo na resposta ao antígeno. A ação é específica e ocorre o aparecimento das células de memória. Será descrita mais detalhadamente no item "Resposta imune específica: breve relato", deste capítulo.

Os mecanismos das respostas imunes inata e adquirida constituem um sistema integrado de defesa do hospedeiro, no qual numerosas células e moléculas funcionam cooperativamente. A imunidade inata proporciona defesa inicial contra micróbios e também induz à resposta específica. Como exemplo, a resposta inflamatória, muitas vezes associada a processos infecciosos, é um "aviso" para que haja o desencadeamento de respostas imunes específicas.

## Funções do sistema imune

a) Defesa e proteção: específica e inespecífica. Pode ser benéfica ao organismo, como, por exemplo, na proteção contra agentes invasores; ou não, como no caso do desencadeamento de resposta auto-imune, na qual a perda da autotolerância imunológica promove o aparecimento de patologias auto-imunes, caracterizadas por reações imunológicas anormais.

b) Homeostasia: capacidade de distinguir o que é próprio (*self*) do que não é próprio (*non-self*).

c) Vigilância: capacidade de detecção e destruição de células neoplásicas.

## Definições importantes

a) Antígeno: substâncias reconhecidas pelo organismo como "não-próprias" (*non-self*). Ex.: Os antígenos eritrocitários poderão ser reconhecidos como não-próprios pelo sistema imune do receptor de concentrado de hemácias. (Figura 1)

a.1) Propriedades

- Imunogenicidade: capacidade de estimular produção de anticorpos. Os antígenos que possuem essa característica são denominados imunógenos.

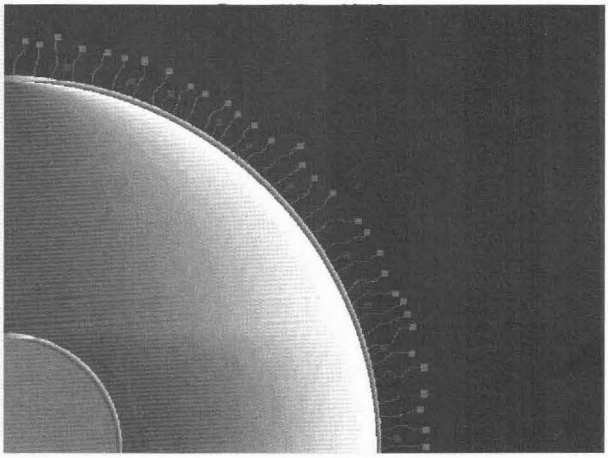


Figura 1. Representação esquemática dos antígenos eritrocitários.

- Antigenicidade: capacidade de interagir especificamente com o produto da resposta imune, seja ela humoral (que termina em produção de anticorpos específicos), seja celular (que culmina com a ativação dos linfócitos T).

b) Imunógenos: geralmente macromoléculas maiores que 10 mil dáltons, capazes de estimular resposta imune, induzindo à formação de anticorpos e se combinando a eles.

c) A habilidade em estimular a resposta imune depende da natureza da substância, de sua complexidade estrutural, do modo da imunização (via, dose, presença de adjuvantes), e das características de cada indivíduo (genéticas, etárias etc.).

c.1) Da natureza da substância: quase toda espécie de molécula biológica, incluindo simples metabólitos intermediários, açúcares, lipídeos, autacóides e hormônios, e também macromoléculas, tais como carboidratos complexos, fosfolipídeos, ácidos nucléicos e proteínas podem servir como antígenos. Entretanto, somente as macromoléculas podem iniciar a ativação linfocítica necessária à resposta imune. A maioria dos imunógenos é de origem protéica (glico ou lipoprotéica). Polissacarídeos também são bons imunógenos. Já ácidos nucléicos e lipídeos são pouco imunogênicos.

d) Tolerância imunológica: uma das propriedades mais importantes do sistema imune é a discriminação entre substâncias estranhas (não-próprias) e comuns (próprias) ao organismo. A falta de resposta à estimulação antigênica é denominada tolerância imunológica e ocorre por inativação funcional ou morte de linfócitos específicos induzidas pelo antígeno, culminando na incapacidade de resposta àquele antígeno. Os antígenos que induzem tolerância são chamados tolerógenos.

e) Autotolerância: a tolerância aos auto-antígenos é uma propriedade também fundamental do sistema imune, e sua falta induz a doenças auto-imunes. Normalmente, todos os auto-antígenos agem como tolerógenos (mais detalhes no capítulo 9, "Anemia hemolítica auto-imune (AHAI)").

f) Epítopo ou determinante antigênico: é o sítio (local) de ligação do antígeno com a imunoglobulina ou receptor de linfócito T. Cada antígeno pode ter um ou mais epítopos.

g) Hapteno: moléculas de peso molecular abaixo de 10 mil dáltons, que possuem somente a capacidade de antigenicidade, mas não a imunogenicidade (não estimulam a produção de anticorpos). Algumas drogas, como a penicilina, agem como hapteno.

h) Anticorpos ou imunoglobulinas: são substâncias (proteínas globulares) produzidas a partir da ativação dos glóbulos brancos do sangue (linfócitos B), que se transformam em plasmócitos e secretam anticorpos, em resposta à introdução de um dado antígeno (imunógeno). Eletroforeticamente, as proteínas séricas são separadas em frações, como albumina e globulinas alfa1, alfa2, beta e gama. Estas últimas, compostas pelos anticorpos (gamaglobulinas). Podem ser das classes ou isótipos: IgG, IgM, IgE, IgA, IgD. (Figura 2)

i) Funções dos anticorpos: a função efetora dos anticorpos é desencadeada com a ligação deste com o antígeno. Vários efeitos biológicos são conhecidos, como, por exemplo, os mais importantes:

i.1) neutralização do antígeno: muitos agentes, como toxinas, drogas, vírus, bactérias e parasitas, iniciam a lesão celular após a adesão à superfície da célula-alvo. Os anticorpos podem impedir essa

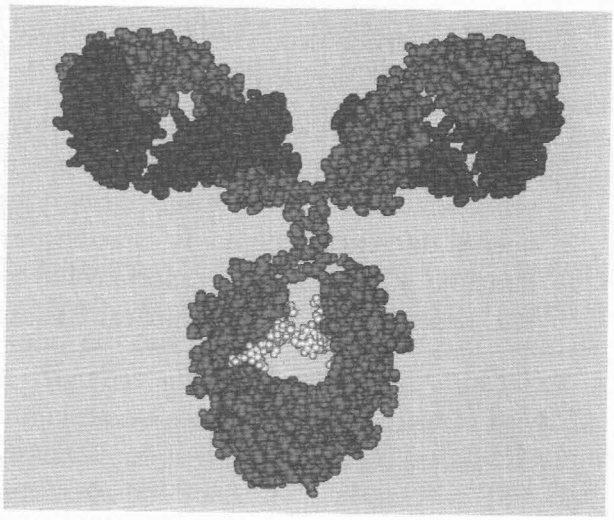


FIGURA 2. MODELO ESPACIAL DE UMA MOLÉCULA DE IMUNOGLOBULINA.

ação ligando-se a determinantes antigênicos do agente, neutralizando a ação tóxica ou infecciosa.

i.2) opsonização: tanto os fagócitos mononucleares quanto os neutrófilos expressam receptores para as porções Fc das moléculas de IgG. A ligação dos anticorpos IgG às células facilita a ação dessas células fagocitárias.

i.3) ativação dos fatores de complemento: essas proteínas séricas (complemento) são ativadas enzimaticamente em cascata, podendo promover a lise osmótica da célula-alvo. Geralmente as IgG e IgM podem iniciar esse processo.

i.4) anticorpos de membrana dos linfócitos B são receptores para antígenos: esta ligação inicia a proliferação celular e secreção de anticorpos específicos pelas células B, como veremos em resposta humoral mais adiante. Na membrana dos linfócitos B podemos encontrar diferentes isótipos de cadeias pesadas das Ig. Por exemplo, células B imaturas expressam IgM, células B maduras não estimuladas podem expressar IgM e D, células de memória imunológica podem expressar qualquer isótipo.

i.5) citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos: várias populações de leucócitos além dos linfócitos T citotóxicos, entre eles os neutrófilos, eosinófilos e as células *natural killer* (NK), são capazes de lisar células-alvo. Muitas vezes é necessário que essas células estejam recobertas por IgG, em processo denominado dependente de anticorpos *antibody dependent cell mediated citotoxicity (ADCC)*.

j) Estrutura básica de uma imunoglobulina: todas as moléculas de anticorpos são semelhantes estruturalmente. Apesar disso, podem ser separadas em classes e subclasses, tomando-se por base as pequenas diferenças quanto às características físico-químicas, como tamanho, solubilidade e comportamento como antígenos. Na Tabela 1, descrevemos as características básicas das imunoglobulinas.

TABELA 1. ESTRUTURA BÁSICA DAS IMUNOGLOBULINAS

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Tipo de cadeias | 2 leves (L) | | 2 pesadas (H) | | |
| | kappa (κ)<br>lambda (λ) | | IgG: gama (γ)<br>IgM: mu (μ)<br>IgA: alfa (α)<br>IgD: delta (δ)<br>IgE: epsílon(ε) | | |
| Pontes dissulfeto | Intracadeia<br>Intercadeia | | | | |
| Regiões | Variáveis (V): VL e VH<br>Constantes (C): CL e CH | | | | |
| Fragmentos | Fab (*antigen binding*): região de ligação c/ag<br>Fc: região cristalizável | | | | |
| Classes | IgG | IgM | IgA | IgD | IgE |
| Subclasses | IgG 1, 2, 3 e 4 | | IgA 1 e 2 | | |

## CLASSE DOS ANTICORPOS IMPORTANTES EM IMUNO-HEMATOLOGIA

Para a imuno-hematologia, os mais importantes são os anticorpos classes IgM e IgG.

a) IgM: molécula pentamérica, de peso molecular 900 mil dáltons, com capacidade de ativar o sistema complemento, mas que não atravessa barreira placentária. São geralmente "frios" (a fixação do anticorpo sobre o antígeno é máxima em baixa temperatura, por exemplo 4 °C, e mais fraca a 25 °C e freqüentemente nula a 37 °C). São produzidos nas respostas primárias, pela ativação dos linfócitos B, em primeira exposição a determinado antígeno. Têm a capacidade de ligar-se a receptores de frações Fc de células fagocitárias. É a imunoglobulina de superfície de células B. (Figura 3)

b) IgG: principal imunoglobulina sérica (75% de todas as Ig); molécula monomérica, de peso molecular 160 mil dáltons, que tem a capacidade de atravessar barreira placentária, pela ligação a receptores Fc das células placentárias. Algumas subclasses têm maior capacidade de ativar o sistema complemento, como IgG 1 e 3, exceto IgG4. São produzidas em respostas secundárias (segunda exposição a determinado antígeno). Provocam a opsonização da célula-alvo. Têm capa-

cidade de ligação a receptores Fc de monócitos, macrófagos, polimorfonucleares, que provoca uma aderência e melhor internalização do antígeno por essas células fagocitárias. (Figura 4)

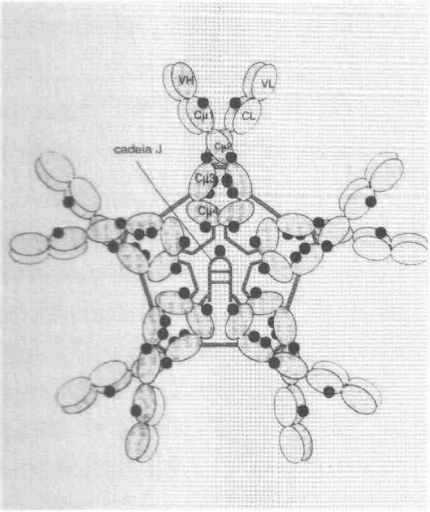



FIGURA 3. MODELO ESPACIAL DE UMA MOLÉCULA DE IGM.

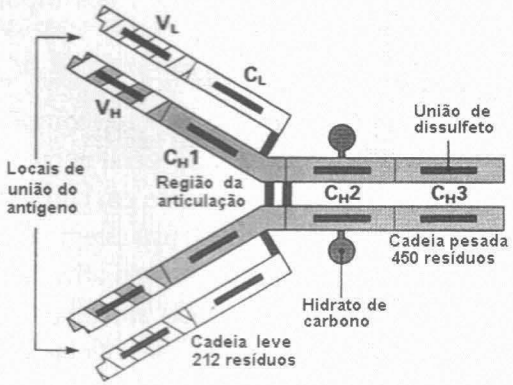



FIGURA 4. MODELO ESPACIAL DE UMA MOLÉCULA DE IGG.

## CLASSIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS

a) De acordo com a origem

- Heteroanticorpos: anticorpos produzidos contra antígenos advindos de indivíduos de espécies diferentes. Ex.: produção de

soro de antiglobulina humana (Coombs) por imunização de coelhos por anticorpos humanos.

- Aloanticorpos: produzidos contra antígenos reconhecidos como "não-próprios" ao indivíduo, mas provenientes de indivíduos da mesma espécie. Ex.: imunização por transfusão sangüínea.
- Auto-anticorpos: produzidos contra antígenos do próprio indivíduo, em geral antígenos de alta incidência na população (e, P, I etc.). Ex.: doenças auto-imunes, como anemia hemolítica auto-imune (AHAI).

b) De acordo com o estímulo

- Imunes: formam-se após ativação do sistema imune. Ex.: após transfusão ou gravidez, contra algum antígeno reconhecido como "não-próprio".
- Naturais: no sistema ABO, por exemplo, anticorpos formam-se contra antígenos não presentes no indivíduo, sem necessidade de contato prévio com o antígeno. Sabe-se que as bactérias que começam a colonizar o trato intestinal a partir do nascimento possuem açúcares similares aos antígenos A e B; conseqüentemente são essas bactérias que vão estimular a formação dos anticorpos anti-A e anti-B. Também ocorre imunização por meio da alimentação, exposição à poeira etc.
- Regulares: a ocorrência é esperada, como, por exemplo, no caso dos anticorpos ABO.
- Irregulares: a ocorrência não é esperada, como, por exemplo, anticorpos formados após aloimunização por transfusão.

c) De acordo com o comportamento em testes imuno-hematológicos

- Completos: promovem aglutinação de hemácias em meio salino. Ex.: anticorpos IgM.
- Incompletos: reagem com o antígeno, porém não produzem aglutinação das hemácias. Precisam de um meio artificial que promova a aglutinação para visualização da reação antígeno-anticorpo. Ex.: anticorpos IgG.

A maioria dos anticorpos completos e naturais é da classe IgM, e os incompletos e imunes da classe IgG ou IgA.

## Resposta imune específica: breve relato

Resposta coletiva e coordenada das moléculas e células responsáveis pela imunidade à introdução de substâncias estranhas (antígenos).

Estudaremos a seguir a resposta específica, na qual o organismo do indivíduo passa a ter papel ativo na produção da resposta. Existe, ainda, a resposta passiva, que não abordaremos neste trabalho, como, por exemplo, no caso da imunização com venenos de cobra (soro antiofídico) em indivíduos picados por esse animal.

a) Mecanismos: o sistema imune executa suas funções de defesa específica mediante dois mecanismos.
   - Resposta humoral, com produção de anticorpos (moléculas efetoras).
   - Resposta celular, em que a própria célula vai de encontro ao antígeno (células efetoras).

b) Órgãos linfóides: as células do sistema imune são produzidas nos órgãos linfóides primários e secundários.
   - Primários: timo e medula óssea.
   - Secundários: linfonodos (gânglios linfáticos), baço, tonsilas (amígdalas), apêndice vermiforme.

c) Linfócitos: o órgão linfóide é formado por tecido, sendo este constituído por células chamadas linfócitos. O sistema imunológico vai executar funções por meio de suas células e seus produtos.

   c.1) Tipos de linfócitos: existem os linfócitos B e T.
   - Os linfócitos B são assim chamados pois demonstrou-se em aves que eles originavam-se da *Bolsa de Fabricius*. Nos mamíferos, nos quais não existe órgão equivalente, estes originam-se da medula óssea. São as únicas células capazes de produzir anticorpos.
   - Os linfócitos T, ou seus precursores, originam-se da medula óssea e migram para o timo, onde amadurecem. Subdividem-se em subpopulações diversas, como Lt citotóxico, auxiliares e supressores. Não produzem anticorpos, mas respondem a antígenos associados à superfície celular, e são não-solúveis;

em resposta à estimulação, vão secretar citocinas, que promovem proliferação e diferenciação de outras células T.

Os linfócitos T expressam diferentes proteínas na membrana, conhecidas por CD (*Cluster of Differentiation*); Lt auxiliares expressam CD4; citotóxicos expressam CD8.

Os linfócitos têm a capacidade de se transformar em células de memória imunológica e em um segundo contato com o antígeno, amplificar a resposta imune.

d) Resposta imune: cada resposta imune é uma intrincada e complexa seqüência de eventos envolvendo diversos tipos celulares. Na resposta humoral, os linfócitos B respondem aos antígenos produzindo células secretoras de anticorpos; na resposta celular, os linfócitos T agem diretamente contra o agente.

e) Fases

e.1) Reconhecimento: é iniciada pelo reconhecimento de antígenos estranhos (de parte deles, denominada epítopo ou determinante antigênico), pelos linfócitos B. Podem ser proteínas, polissacarídeos, lipídeos ou outras substâncias químicas extracelulares, que se ligam às Ig de superfície. Esses linfócitos específicos desenvolveram-se sem necessidade de estimulação prévia. Existem clones de linfócitos capazes de reconhecer muitos antígenos.

e.2) Ativação: proliferação dos linfócitos antígeno-específicos e amplificação da resposta imune. As células começam a se diferenciar e a se transformar em células efetoras, para eliminação do antígeno, ou ainda em células de memória imunológica. Os linfócitos B transformam-se em plasmócitos e secretam anticorpos. Os linfócitos T são ativados por pequenas seqüências peptídicas das proteínas estranhas e diferenciam-se em outros linfócitos, que podem atrair células fagocitárias ou eliminar diretamente as substâncias estranhas, como, por exemplo, proteínas virais.

e.3) Efetora: nesta fase, as células efetoras originadas da ativação executam sua função, muitas vezes com auxílio de outras células e substâncias.

Em cada fase desse processo, os linfócitos e *células apresentadoras de antígeno* podem relacionar-se com outros sistemas conhecidos

como sistema complemento (que culmina com a destruição do antígeno), sistema das cininas (que produzem substâncias farmacologicamente ativas) e sistema fibrinolítico (que inicia processo inflamatório).

O principal mecanismo de eliminação de agentes extracelulares, como, por exemplo, bactérias, é a resposta humoral, em que os anticorpos ligam-se aos elementos e promovem sua inativação e eliminação; enquanto para agentes intracelulares, como, por exemplo, vírus, ocorre principalmente a resposta celular, pois os antígenos estão inacessíveis aos anticorpos.

- Resposta celular: as linfocinas ativam os linfócitos T citotóxicos (conhecidos também por CD8), que secretam substâncias citolíticas que destruirão o antígeno, e proliferam-se em células de memória, ou ativam neutrófilos (células brancas do sangue), que migrarão para o foco infeccioso, travando batalha contra o antígeno, resultando quase sempre em sua morte, o que ocasionará a formação do chamado *pus*.
- Resposta humoral: as linfocinas ativam os linfócitos B, que poderão seguir duas vias: a diferenciação em plasmócitos - que secretarão substâncias conhecidas como anticorpos, que se ligam especificamente ao antígeno, inativando-o - ou proliferando-se em células de memória.

f) As células de memória registrarão o primeiro contato com o antígeno. Em segunda exposição, amplificarão a resposta imune. São formadas a partir da resposta primária humoral ou celular.

g) As substâncias produzidas pelos linfócitos T são responsáveis pela rejeição aos transplantes, e os produzidos pelos linfócitos B pelas reações transfusionais hemolíticas.

h) Cinética dos anticorpos

h.1) Resposta primária: determinada após o primeiro contato com o imunógeno. Suas principais características são:

- A necessidade de um tempo maior para a produção de anticorpos: a primeira exposição ao antígeno pode levar a uma aloimunização primária com produção de baixos níveis de anticorpos, geralmente da classe IgM, detectáveis dentro de três a quatro semanas após o estímulo.

- A resposta primária é caracterizada pela detecção, no soro do indivíduo, de crescentes quantidades de anticorpos específicos. A concentração de anticorpos logo atinge um ponto máximo, declinando gradualmente para níveis basais.

h.2) Resposta secundária: determinada após a segunda exposição ao mesmo antígeno. É caracterizada por um tempo menor para produção de altos níveis de anticorpos predominantemente IgG, detectáveis dentro de um a dois dias.

A resposta secundária é dada por células de memória (células T e B), clonadas durante a resposta primária ao antígeno.

Os anticorpos resultantes de uma resposta secundária têm maior avidez pelo antígeno que os anticorpos resultantes da resposta primária e são produzidos contra doses significativamente inferiores do antígeno.

## Resposta imunológica em aloimunização eritrocitária

As reações imunológicas à transfusão eritrocitária compreendem basicamente a aloimunização a antígenos eritrocitários (formação de anticorpos) e a hemólise por incompatibilidade.

Os antígenos das membranas celulares, como os antígenos de histocompatibilidade (sistema HLA) e os antígenos dos grupos sangüíneos eritrocitários (em particular os dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) são os antígenos mais imunogênicos de nossa espécie.

- A formação de anticorpos contra antígenos eritrocitários é o primeiro efeito imunológico a ser reconhecido após transfusão de glóbulos vermelhos.
- Quando um indivíduo é exposto aos antígenos eritrocitários que não lhes são próprios, seu organismo é capaz de rejeitá-los. A produção de anticorpos é parte do processo de rejeição.
- Alguns estudos mostram que a probabilidade de um indivíduo produzir um ou mais anticorpos antieritrocitários é de aproximadamente 1% por unidade de sangue transfundida.

- As diferentes incidências dos anticorpos são devidas à imunogenicidade dos antígenos e à freqüência de indivíduos antígeno-negativos e, portanto, indivíduos imunologicamente suscetíveis em uma população.[2]

## Fundamentos dos testes imuno-hematológicos

As reações *in vivo* entre antígenos e anticorpos produzem imunocomplexos que não são visíveis. A necessidade de se investigar as reações imunológicas *in vitro* levou ao desenvolvimento de uma variedade de métodos, com objetivo de detectar e quantificar as reações antígeno-anticorpo.[3]

Em imuno-hematologia, procuramos pesquisar *in vitro* a interação entre antígenos e anticorpos, seja para pesquisa dos antígenos, como, por exemplo, na fenotipagem direta ABO, quanto para pesquisa de anticorpos regulares (ex.: ABO) ou irregulares (ex.: anti-C) no soro dos indivíduos, por meio do método de aglutinação de hemácias ou hemaglutinação, que culmina com a formação de aglutinatos de hemácias sensibilizadas por anticorpos.

Para isso, devemos conhecer as duas etapas desse processo: a reação entre antígeno e anticorpo propriamente dita (etapa de sensibilização) e o fenômeno da hemaglutinação (etapa da visualização), para que possamos compreender e aplicar seus fundamentos na rotina do dia-a-dia.

Podemos, ainda, alterar algumas condições, para incrementar a formação e visualização desses aglutinatos.

### Características bioquímicas da reação antígeno × anticorpo

a) A principal característica da interação do antígeno (Ag) com o anticorpo (Ac) é a especificidade, definida pela reatividade complementar entre os sítios de ligação do anticorpo e os determinantes antigênicos que induziram à sua formação; ou ainda, como a capacidade do sítio de ligação do anticorpo em reagir com um único

---

2 L. M. Castilho, "Reações imunológicas à transfusão de eritrócitos e investigação laboratorial", em *Imunohematologia Eritrocitária: Sistema de Treinamento a Distância (STD)*, vol. 11, Belo Horizonte, 1996.

3 L. Melo & J. A. Santos, "A reação de aglutinação aplicada aos grupos sangüíneos", em *STD*, vol. 2, Belo Horizonte, 1996.

determinante antigênico. Várias moléculas de anticorpos podem reagir com um único antígeno composto de vários epítopos antigênicos.

b) Reações cruzadas podem ocorrer por similaridade de epítopo(s) na estrutura de antígenos complexos, o que provocará a reação de determinado anticorpo com diferentes antígenos que apresentem a similaridade de epítopo(s) mencionada.

c) Ocorre por uma multiplicidade de reações químicas não covalentes, e, portanto, individualmente fracas. Mas o somatório das reações, como pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas, Van der Waals e ligações hidrofóbicas, vão conferir à reação considerável força de coesão.[4]

   c.1) Forças eletrostáticas: atração entre grupamentos iônicos de cargas elétricas opostas situadas nas cadeias laterais das proteínas.

   c.2) Pontes de hidrogênio: entre grupos hidrofílicos ($OH, NH_2$, COOH); são ligações fracas e reversíveis.

   c.3) Ligações hidrofóbicas: da mesma forma que as gotas de óleo em água se fundem para formar uma gota maior, os grupos hidrofóbicos não-polares, como cadeias laterais de valina, leucina e fenilalanina, tendem a associar-se em meio aquoso. Quando os grupos hidrofóbicos de duas proteínas se unem de modo a expelir moléculas de água entre eles, a superfície livre em contato com a água fica reduzida, havendo então força de atração. Calcula-se que essas forças representem até 50% da força total de ligação antígeno × anticorpo.[5]

   c.4) Forças de Van der Waals: são forças intermoleculares que dependem da interação entre as nuvens de elétrons externas. Comparada a uma perturbação temporária de elétrons em uma molécula, formando um dipolo que induz uma perturbação dipolar na outra molécula, passando a haver uma força de atração entre os dipolos.

d) As reações antígeno-anticorpo obedecem ao conceito de chave-fechadura, em que os sítios de ligação são complementares e específicos. As forças descritas anteriormente dependem da aproximação de ambas as moléculas (antígeno e anticorpo), assumindo, então, gran-

---

4 L. Melo & J. A. Santos, "A reação antígeno-anticorpo e o complemento em imunologia eritrocitária", em *STD*, Belo Horizonte, 1996.

5 I. M. Roitt, *Imunologia* (5ª ed. São Paulo: Atheneu, 1998).

de magnitude. Tendo formas complementares de nuvens de elétrons no sítio combinatório do anticorpo e no determinante de superfície do antígeno, as moléculas podem se encaixar perfeitamente como chave e fechadura.

e) Essa reação apresenta também a propriedade de reversibilidade, podendo dissociar-se prontamente, dependendo da força de ligação, definida pela constante de equilíbrio da reação, e da quantidade de energia que fornecermos ao sistema. Os processos de eluição podem ocorrer principalmente se fornecermos calor ao sistema, modificarmos o pH e/ou força iônica, utilizarmos solventes orgânicos (como éter e clorofórmio). Esse é o princípio dos métodos de eluição, utilizados especialmente em casos de testes de antiglobulina humana positivos, conforme descreveremos no capítulo 3, "Teste da antiglobulina humana".

f) A força da reação de um único determinante antigênico e um único sítio de ligação do anticorpo é denominada afinidade. É possível quantificar-se essa energia de fixação, utilizando-se o princípio de ação das massas e a conseqüente determinação das constantes de equilíbrio e afinidade.

Sucintamente, representaremos a equação:

$Ag + Ac \leftrightarrow AgAc$

$(Ag)\ (Ac)\ k' = (AgAc)\ k$

onde:

(Ag) = concentração de antígenos (mol/L)

(Ac) = concentração de anticorpos (mol/L)

k e k′ = constantes de associação de dissociação do complexo Ag-Ac

g) Avidez é a força resultante da ligação entre um antígeno com muitos determinantes ou epítopos e anticorpos multivalentes.

h) O que são anticorpos frios e quentes?

Compreendendo a termodinâmica da reação Ag×Ac, é possível entender por que os anticorpos são classificados em frios ou quentes.

h.1) Toda reação Ag×Ac é exotérmica, ou seja, libera calor. Portanto, a entalpia da reação é negativa.

h.2) Anticorpos frios: uma variação da entalpia fortemente negativa indica uma reação com muita liberação de calor. Então, podemos concluir que na reação entre partes iguais de ag e ac, a fixação do anticorpo ao antígeno é máxima em baixas temperaturas, cerca de 4 °C, decrescendo com a elevação até 37 °C. Geralmente uma IgM tem maior afinidade pelo antígeno a 4 °C (temperatura ótima), decrescendo com a elevação da temperatura, como já dissemos. Ex.: anti- I, -i, anticorpos ABO, entre outros.

h.3) Anticorpos quentes: ao contrário, quando existe menor variação de entalpia, a reação libera menos calor e a afinidade do anticorpo por seu antígeno específico é baixa em qualquer temperatura de reação (4 °C a 37 °C). Os anticorpos IgG geralmente demonstram esse comportamento e são preferencialmente detectados a 37 °C. Ex.: anticorpos contra antígenos dos sistemas Rh, Kell, Kidd, entre outros.

Alguns anticorpos IgM podem apresentar grande amplitude térmica, reagindo também a 37 °C.

## Fenômeno da aglutinação de hemácias (hemaglutinação)

As reações *in vivo* entre antígenos e anticorpos produzem imunocomplexos que não são visíveis. A necessidade de se investigar as reações imunológicas *in vitro* levou ao desenvolvimento de uma variedade de métodos, com o objetivo de detectar e quantificar as reações antígeno-anticorpo.

a) Aglutinação: é um fenômeno de mecanismo complexo. Em imunohematologia, o método da hemaglutinação é muito utilizado para a visualização desse fenômeno, em que ocorre formação de grumos de células que, nesse caso, são as hemácias. Chamamos esses grumos de aglutinatos. (Figura 5)

A aglutinação pode ser de dois tipos: específica ou não-específica.

- *Específica:* uma suspensão de hemácias em solução fisiológica (NaCl a 0,85 %) constitui um sistema estável, ou seja, os glóbulos mantêm certa distância uns dos outros. Essa estabilidade é devida ao equilíbrio entre as cargas elétricas das hemácias e a nuvem iônica que as circundam, e pode ser alterada pela introdução de anticorpos específicos, que se fixarão aos antígenos da mem-

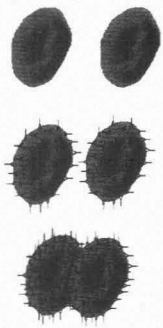


FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AGLUTINAÇÃO DE ERITRÓCITOS. ACIMA: ERITRÓCITOS NÃO SENSIBILIZADOS EM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA (NACL 0,85%) SE REPELEM. NO MEIO: ERITRÓCITOS SENSIBILIZADOS POR ANTICORPOS INCOMPLETOS NÃO AGLUTINAM, POIS O POTENCIAL ZETA CRÍTICO (PZC) NÃO FOI ATINGIDO. ABAIXO: ERITRÓCITOS SENSIBILIZADOS POR ANTICORPOS COMPLETOS (OU INCOMPLETOS + SORO DE ANTIGLOBULINA HUMANA) AGLUTINAM, POIS O PZC FOI ATINGIDO.

brana eritrocitária, neutralizando cargas elétricas e provocando a aglutinação das hemácias.

- Não-específica ou pan-aglutinação: corresponde à aglutinação de hemácias normais, sem anticorpos específicos ligados aos antígenos, por interferência de substâncias presentes no meio, como macromoléculas (polibreno, ficol, dextran etc.), íons metálicos (sílica coloidal) e compostos carregados ou neutros. Essas substâncias alteram o equilíbrio iônico e a constante dielétrica do meio, baixando o potencial zeta da suspensão globular até um ponto crítico, em que a aglutinação dos glóbulos ocorre. Ex.: aglutinação decorrente de reações realizadas em tubos de ensaio mal lavados, impregnados por detergentes.

Atenção: o modelo das pontes entre anticorpos, que podemos encontrar descrito em alguns livros, preconiza que a reação específica provoca a formação de uma malha, em que os anticorpos se ligam aos sítios antigênicos de outras células vizinhas. Esse modelo, porém, não é convincente, pois não consegue explicar a ocorrência de reações não-específicas, na ausência desses anticorpos. Já o modelo físico-químico, que tentaremos descrever no item "Potencial zeta", leva em consideração a distância média que separa as hemácias em suspensão. Essa distância pode ser diminuída pela adição de anticorpos ou outras substâncias ao meio, até um ponto crítico em que a aglutinação ocorre. Observe o exemplo no esquema a seguir.

ESQUEMA REPRESENTATIVO DO FENÔMENO DA HEMAGLUTINAÇÃO

Hemácias não-sensibilizadas
em solução fisiológica

Força de repulsão

Hemácias sensibilizadas por anticorpos
incompletos ou por poucos anticorpos

A distância diminui, mas não existe a aglutinação

Hemácias sensibilizadas por anticorpos completos,
grande quantidade de anticorpos ou adição de
substâncias potencializadoras



Aglutinação

## Potencial zeta

Em estudos de migração eletroforética, as hemácias comportam-se como partículas eletronegativas. Os grupos carboxílicos ($COOH^-$) das sialoglicoproteínas integrantes da membrana eritrocitária são os maiores responsáveis por essa eletronegatividade.

Como cargas iguais se repelem, os eritrócitos em suspensão permanecem separados uns dos outros em meio salino. Os eletrólitos contidos no meio envolvem cada hemácia como uma nuvem de íons positivos que se torna menos densa à medida que se distancia do glóbulo.

A diferença de potencial criada entre a nuvem de cátions atraídos pelas cargas elétricas negativas da membrana eritrocitária e meio é chamada potencial zeta. (Figura 6)

Portanto, a força de repulsão entre as hemácias depende do potencial zeta.

Pollack desenvolveu a seguinte fórmula para potencial zeta:

$$Z = \frac{\gamma}{D\sqrt{\mu}}$$

Onde: Z = potencial zeta

$\gamma$ = eletronegatividade da hemácia

D = constante dielétrica do meio

$\mu$ = força iônica do meio

Diminuindo-se, lentamente, o potencial zeta do sistema, constata-se que a aglutinação ocorre em determinado valor, que é o potencial zeta crítico (PZC).

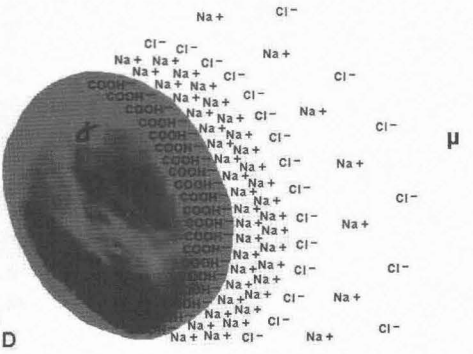



FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ERITRÓCITO EM SOLUÇÃO FISIOLÓGICA (NACL 0,85%).

$$\text{Potencial zeta} = \frac{\gamma}{D\sqrt{\mu}}$$

O potencial zeta de um sistema pode, então, ser modificado de duas maneiras:

a) Redução da carga elétrica das hemácias ($\mu$):

- Por fixação de anticorpos: como os epítopos dos anticorpos são carregados positivamente, quando se fixam à membrana eritrocitária, neutralizam as cargas negativas dos antígenos específicos, reduzindo o potencial zeta.
- Por tratamento enzimático: pela adição de enzimas proteolíticas, como a bromelina, papaína, ficina, tripsina, que removem fragmentos de proteínas da membrana, clivando glicoproteínas da superfície celular. Trataremos melhor das enzimas no capítulo 4, "Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares".

As enzimas expõem alguns antígenos membranários, principalmente ABO e Rh, e outros como P, I, Lewis e Kidd, mas destroem antígenos MNS, Duffy e $Xg^a$.

b) Variação da composição do meio

- Por adição de substâncias macromoleculares, como albumina bovina, polietilenoglicol (PEG), polibreno, que alteram a constante dielétrica do meio (D).
- Modificação da força iônica ($\delta$), utilizando-se, por exemplo, solução de baixa força iônica (LISS).

A aglutinabilidade de um sistema é tanto maior quanto mais baixo for o valor do potencial zeta.

c) Outros fatores influenciam na indução à hemaglutinação, como:

- pH: a constante de equilíbrio é influenciada pelo pH. A ligação dos anticorpos aos antígenos eritrocitários é ótima em pH entre 6,5 e 7,5.
- Temperatura: os anticorpos possuem características próprias, como, por exemplo, os anticorpos IgM, e as crioaglutininas reagem melhor entre 4 °C e 22 °C, e os IgG a 37 °C, como já explicamos anteriormente.
- Concentração dos anticorpos: a estrutura básica de uma imunoglobulina é um monômero e possui dois sítios de ligação com o antígeno na porção variável. É importante que se mante-

nha a relação ótima entre quantidade de anticorpos e antígenos nos testes imuno-hematológicos, para que não ocorram falsos resultados. Por exemplo, um excesso de anticorpos provocam o efeito prozona, e nenhuma aglutinação é observada. Da mesma maneira, o excesso de antígenos pode produzir sensibilização insuficiente para alterar o potencial zeta ao ponto crítico. Portanto, recomendamos observar sempre a indicação dos manuais de procedimentos operacionais padronizados (POP) e/ou bulas dos reagentes utilizados na rotina, para que essas quantidades sejam respeitadas.

- Localização e número de sítios antigênicos: a localização do antígeno e sua quantidade na membrana do eritrócito são importantes para propiciar melhor acesso dos anticorpos específicos, e portanto uma reação de aglutinação mais intensa. Isso é observado principalmente quando:
  - Os antígenos expressam-se fracamente, como no caso de subgrupos ABO ou ainda antígenos D fracos (ver capítulos 5, "Sistema ABO (ABO 001) e Hh (H 018)", e 6, "Sistema Rh (ISBT 004)").
  - Hemácias de indivíduos homozigotos para determinados genes produtores de antígenos apresentam maior quantidade destes, e portanto a reação Ag×Ac é mais forte; ao contrário, se as hemácias forem de indivíduos heterozigotos, a quantidade de antígenos expressa será menor, assim como a reação de aglutinação.
  - Antígenos pouco acessíveis na membrana eritrocitária também provocam fraca reatividade nos testes.
  - Em ambos os casos anteriores, as reações resultantes são de menor intensidade, podendo até mesmo ser negativas.

- A resposta primária é caracterizada pela detecção, no soro do indivíduo, de crescentes quantidades de anticorpos específicos. A concentração de anticorpos logo atinge um ponto máximo, declinando gradualmente para níveis basais.

h.2) Resposta secundária: determinada após a segunda exposição ao mesmo antígeno. É caracterizada por um tempo menor para produção de altos níveis de anticorpos predominantemente IgG, detectáveis dentro de um a dois dias.

A resposta secundária é dada por células de memória (células T e B), clonadas durante a resposta primária ao antígeno.

Os anticorpos resultantes de uma resposta secundária têm maior avidez pelo antígeno que os anticorpos resultantes da resposta primária e são produzidos contra doses significativamente inferiores do antígeno.

## Resposta imunológica em aloimunização eritrocitária

As reações imunológicas à transfusão eritrocitária compreendem basicamente a aloimunização a antígenos eritrocitários (formação de anticorpos) e a hemólise por incompatibilidade.

Os antígenos das membranas celulares, como os antígenos de histocompatibilidade (sistema HLA) e os antígenos dos grupos sangüíneos eritrocitários (em particular os dos sistemas Rh, Kell, Duffy e Kidd) são os antígenos mais imunogênicos de nossa espécie.

- A formação de anticorpos contra antígenos eritrocitários é o primeiro efeito imunológico a ser reconhecido após transfusão de glóbulos vermelhos.
- Quando um indivíduo é exposto aos antígenos eritrocitários que não lhes são próprios, seu organismo é capaz de rejeitá-los. A produção de anticorpos é parte do processo de rejeição.
- Alguns estudos mostram que a probabilidade de um indivíduo produzir um ou mais anticorpos antieritrocitários é de aproximadamente 1% por unidade de sangue transfundida.

# Fundamentos de genética básica e molecular

2

" ...e Deus criou o homem,
à sua imagem e semelhança..."

Com os avanços da ciência e a possibilidade da manipulação dos genes, o homem também será capaz de criar outros homens?

## Breve histórico

A genética clássica iniciou-se com os estudos do monge austríaco Gregor Mendel, no período de 1866 a 1871, que realizou experimentos utilizando inicialmente ervilhas. A partir de suas experiências, ele formulou, então, as conhecidas leis de Mendel, que demonstram como a hereditariedade pode ser estudada experimentalmente.

Seus estudos e publicações permaneceram no anonimato, até que em 1900, um grupo liderado por De Vries, Correns e Tschermak retomou seus estudos.

Em 1909, W. Johannsen apresenta a primeira definição de gene como a unidade básica da informação genética, partindo da teoria cromossômica de W. S. Sutton, proposta em 1903.

Estabelecidas as bases experimentais da hereditariedade, a partir de 1910 outro grupo de pesquisa (T. H. Morgan, C. Bridges, A. Sturtevant e H. Muller) descobriu o organismo ideal para desenvolvimento de suas pesquisas, a mosca de fruta *Drosophila melanogaster*. Com esses estudos, compreendeu-se o modo pelo qual diferentes combinações de genes trabalham juntas no controle da herança de características individuais, e desenvolveram-se técnicas e métodos-padrão de análise genética, incluindo os que mapeiam as posições dos genes nos cromossomos.

A partir de 1930, reconhecendo-se os genes como entidades físicas moleculares, biólogos iniciaram novos estudos por métodos bioquímicos e biofísicos. Surgiu, então, um novo ramo da genética, a Biologia Molecular.

O modelo atual da molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA), em forma de dupla hélice, surgiu em 1953, a partir das observações de Watson e Crick e de estudos anteriores de Rosalind Franklin e outros cientistas sobre a molécula. A estrutura do polinucleotídeo já era conhecida, mas não bem compreendida.

O processo da expressão gênica foi descrito por Francis Crick, em 1958, quando se postulou a transferência de informações do DNA para outra molécula - o ácido ribonucléico (RNA). Essa teoria foi batizada de Dogma Central.

## Projeto Genoma Humano

A partir da década de 1980, vários cientistas envolveram-se em grupos de pesquisa com o objetivo de mapear o genoma humano. Esse projeto envolve laboratórios dos Estados Unidos, Japão, Europa, entre outros, congregando cientistas de várias nacionalidades. Os resultados apresentados já propiciaram subsídios para desenvolvimento de métodos de clonagem e outros experimentos de engenharia genética.

O futuro promete uma reviravolta com os cientistas trabalhando para evitar a transmissão de caracteres indesejáveis, desenvolvendo projetos de terapias genéticas e muito mais. A data-limite para o término do projeto está estimada para 2005.

Enquanto isso, o homem trava a mais dura das batalhas, entre a ética e a ciência, a fim de impor os limites dos avanços biotecnológicos.

# Introdução à genética mendeliana

A transmissão de caracteres é controlada pelos genes.

Os organismos vivos são estruturas complexas e completas, e suas características transmitidas de geração em geração. Ou seja, quando geramos descendentes, todas as informações transmitidas são controladas pelos genes. Algumas características, como os grupos sangüíneos, são herdadas por genes únicos, mas as outras são controladas por diversos genes trabalhando conjuntamente.

Genes são transmitidos seguindo modelos matematicamente estudados.

São as unidades básicas de informação formadas por moléculas, e estão contidos no núcleo celular. Ao estudo dos genes e sua interação celular denominamos Genética ou Biologia Molecular.

## Conceitos de genética clássica

a) Genes: unidades básicas de informação, que carregam as instruções necessárias à formação de proteínas. Estão contidos nas moléculas de DNA, em lugares (*locus*) determinados.

b) *Locus*: é a posição precisa que um gene ocupa no cromossomo.

c) Cromossomos são estruturas responsáveis pela transmissão das características hereditárias, pois ao longo deles existem os genes. Cromossomos podem ser visualizados espiralizados, quando a célula inicia seu processo de divisão. Ficam mais espessos e encurtados, com cada filamento visível individualmente. Nas células em interfase ("repouso"), eles se encontram desespiralizados, então denominados de cromatina. Os cromossomos contêm todas as "dicas" para a criação e a manutenção da vida. São mais de três bilhões de bases no DNA, das quais apenas 10% a 15% são partes de genes.

   Cada cromossomo contém milhares de genes.

d) Centrômero é o ponto do cromossomo que deve aderir-se a um microtúbulo do fuso mitótico, para coordenar a migração desse cromossomo para um dos pólos da célula, durante o processo de divisão celular.

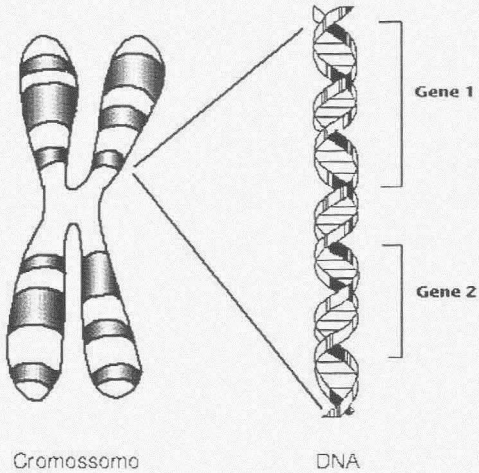



FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CROMOSSOMO, GENES E DNA.

e) DNA ou ácido desoxirribonucléico (ADN): molécula polimérica composta por milhões de átomos. Em forma de fita espiral, forma uma dupla hélice. Essa fita é formada pela unidade química básica, denominada nucleotídeo (que será descrito adiante).

f) Genes alelos: as células possuem cromossomos em duplas, ou homólogos. Esses cromossomos carregam versões alternativas (diferentes) dos mesmos genes, que são chamados de alelos. Estes estão sempre na mesma posição, ou *locus*, dos cromossomos homólogos. Controlam a mesma característica, mas geralmente somente um deles se expressa. Na espécie humana, freqüentemente, os genes possuem dezenas de diferentes alelos, mas sempre encontraremos apenas dois alelos de cada gene por célula. Essas diferenças surgem de trocas em pares de bases, ou mesmo de deleções ou inversões (mutações) em trechos dos cromossomos (ver "Mutação genética", mais adiante).

Portanto: genes alelos não são necessariamente idênticos.

Quando, nas células de um indivíduo, os genes alelos para um determinado caráter não são idênticos, o indivíduo é denominado heterozigoto para esse caráter. Quando são idênticos, ele é denominado homozigoto para o caráter (itens "Homozigose" e "Heterozigose").

g) Genes ligados (*linked*): são aqueles que estão num mesmo cromossomo.

h) Alelos dominantes e recessivos: quando dois alelos coexistem em uma mesma célula, muitas vezes somente um deles produz seus efeitos, gerando fenótipo (alelo dominante). O outro alelo não será expresso (alelo recessivo).

i) Alelos co-dominantes: como nos grupos sangüíneos, por exemplo, os dois genes são expressos igualmente, produzindo fenótipos. Ex.: genes A e B no mesmo cromossomo produzem o fenótipo AB na hemácia.

j) Genótipo: coleção de genes alelos herdados dos progenitores. Somente alguns alelos são expressos, e outros permanecem "mascarados"; mas, ambos são passíveis de serem transmitidos aos sucessores.

k) Fenótipo: todas as características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas em um indivíduo. Em parte, são determinadas pelos genes, mas outra parte corresponde à interação do indivíduo com o meio (influência de fatores externos). Ex.: exercício e dieta podem alterar a conformação corpórea do indivíduo, alterando suas características herdadas.

l) Cariótipo: é o número, tamanho e forma dos cromossomos de células diplóides. É uma análise que se faz do conjunto de cromossomos de uma espécie. Normalmente, isolam-se os cromossomos dos linfócitos (glóbulos brancos do sangue), fotografam-se, ampliam-se e comparam-se aos cromossomos normais. Uma alteração nesse padrão pode indicar anomalias genéticas. Ex.: a síndrome de Down corresponde a uma trissomia do cromossomo 21.

m) Células diplóides: células que contêm um par de cada cromossomo, herdado dos dois progenitores. Nas células do corpo de quaisquer seres vivos, encontramos um número definido de cromossomos, que é característico para cada espécie. Uma célula humana possui 46 cromossomos (diplóide = 2n) em seu genótipo (23 pares). Entre eles, 22 homólogos autossômicos e 2 determinantes do sexo (X e Y).

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DO CARIÓTIPO HUMANO, COM 23 PARES DE CROMOSSOMOS.

n) Número de cromossomos em células diplóides (2n) de algumas espécies. Este número 2n é encontrado em todas as células somáticas e germinativas.

| Espécie | Número de cromossomos |
|---|---|
| Cebola | 16 |
| Mamão | 18 |
| Cão | 78 |
| Boi | 60 |
| Sapo | 22 |
| Café | 44 |
| Drosófila | 8 |

o) Células haplóides: células que contêm apenas um dos cromossomos homólogos de cada par. As células germinativas dão origem aos gametas sexuais masculinos (espermatozóides) e femininos (óvulos), que apresentam número cromossômico haplóide (n). Para chegar a esse número reduzido, as células sofrem um processo de divisão de-

nominado meiose, para que, depois da fecundação, o ovo mantenha o número diplóide (2n), característico da espécie. O conjunto de genes que especificam todos os caracteres que podem ser expressos em um organismo recebe o nome de genoma da espécie. Assim, o genoma do homem é igual a 23 pares de cromossomos.

p) Cromossomos sexuais: existe uma importante diferença entre as células masculinas e femininas. Nas mulheres, as células diplóides sempre carregam um par de cromossomos denominados X. Em homens, temos um cromossomo X e um Y. A combinação destes determina o sexo do indivíduo. Portanto, mulheres terão genótipo XX e homens XY. Mas esses cromossomos sexuais não apenas determinam sexo: existem vários outros genes contidos neles. Algumas características são exclusivas de cromossomos do tipo X e outras do tipo Y. Teremos, portanto, alguns fenótipos herdados dos cromossomos sexuais (herança ligada a sexo). Ex.: daltonismo e hemofilia.

q) Autossomos ou cromossomos autossômicos são aqueles que não determinam sexo.

r) Homozigose: célula que contém alelos idênticos para uma mesma característica. Ambos podem ser dominantes ou recessivos, mas a característica por eles determinada sempre será expressa, pois nenhum alelo está "mascarado" pelo outro.

s) Heterozigose: uma célula contendo diferentes alelos para determinada característica, geralmente um dominante e outro recessivo, em que o dominante expressará seus efeitos. Nas relações de co-dominância temos também diferentes alelos, mas ambos expressando suas características.

t) Mutação genética: durante o processo de divisão celular e a reprodução sexuada, os genes se rearranjam e combinam as características herdadas de várias maneiras. Os genes podem sofrer alterações por meio de mutações e alterar essas informações genéticas. Mutações são *acidentes químicos* que afetam um pequeno pedaço do cromossomo ou todo ele, alterando a seqüência dos nucleotídeos na molécula de DNA. Podem ocorrer em qualquer tipo de célula, tanto da linhagem germinativa quanto somática. Essas mutações podem ou não provocar o aparecimento de um novo fenótipo.

Entre os tipos de mutação na seqüência de DNA podemos citar:

- Deleção: alteração da seqüência em uma molécula de DNA, pela remoção de um ou mais nucleotídeos.
- Inserção: alteração da seqüência em uma molécula de DNA, pela adição de um ou mais nucleotídeos.
- Inversão: alteração da seqüência em uma molécula de DNA, pela remoção de um segmento seguido de sua reinserção em orientação oposta.
- *Crossing-over*: recombinação entre as moléculas de DNA, com troca de nucleotídeos entre cromossomos durante a meiose.
- Mutação de ponto: substituição de um nucleotídeo por outro no DNA. Pode alterar o código de uma trinca de bases (códon) e levar à substituição de uma trinca de bases por outra.

u) Desordens ou doenças genéticas: às vezes, as instruções contidas no *livro* (DNA) produzem características *erradas*, que vão promover o aparecimento de fenótipos indesejáveis, muitas vezes letais. Exs.: síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21), síndrome de Klinefelter (trissomia dos cromossomos sexuais -XXY); anemia falciforme, hemofilia, entre muitas outras.

## Estudo químico dos ácidos nucléicos

Vale relembrar:

- Uma célula normal pode conter em torno de 100 mil genes, arranjados em pares de cromossomos.
- São mais de três bilhões de bases no DNA, das quais apenas 10% a 15% são partes de genes.
- Os cromossomos contêm todas as "dicas" para a criação e a manutenção da vida.

Então, a partir das informações contidas nos genes, a célula pode produzir proteínas.

a) Ácidos nucléicos: compostos orgânicos, formados de unidades denominadas nucleotídeos. Temos dois tipos: DNA e RNA. O DNA, conforme foi anteriormente descrito, é uma molécula contida no núcleo celular,

em forma de dupla hélice, que carrega todas as informações genéticas (genes). O RNA, faz o *transporte* dessas informações para os ribossomos no citoplasma, para a síntese de proteínas.

b) Aminoácidos: existem vinte diferentes tipos, que podem arranjar-se de várias formas, em seqüências, segundo informações genéticas. São constituídos de átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio, com pelo menos um grupamento amina ($NH_2$). A ligação química entre os aminoácidos adjacentes denomina-se ligação peptídica, e a cadeia, polipeptídeo. O organismo não pode produzir aminoácidos, mas pode convertê-los em outros. Então, aminoácidos essenciais da dieta, em torno de dez diferentes tipos, e outros dez, que são convertidos por reações químicas, são utilizados na formação das proteínas.

c) Proteínas: estão entre as substâncias mais complexas do organismo vivo e podem constituir mais da metade do peso seco de uma célula. São seqüências determinadas de aminoácidos, ou polímeros. Existem centenas de diferentes proteínas, com funções específicas, desde estruturais (Ex.: cabelos, unhas), enzimas que são catalisadoras de reações químicas, controladoras da permeabilidade das membranas, reguladoras da concentração de metabólitos, entre outras funções.

d) Nucleotídeos: formados por bases nitrogenadas (púricas e pirimídicas, como adenina, citosina, guanina e timina - no DNA - ou uracila - no RNA), açúcar (desoxirribose no DNA e ribose no RNA) e ácido fosfórico. As bases nitrogenadas funcionam como um *alfabeto*, e é a partir dela que montamos as informações ou código genético.

e) Pareamento de bases: cada ácido nucléico (DNA ou RNA) contém quatro bases nitrogenadas, que possuem capacidade de pareamento específico. Ex.: A-T, C-G.

f) RNA: o RNA é uma macromolécula de ácido nucléico muito semelhante ao DNA. Difere quimicamente deste no açúcar (ribose) e nas bases pirimídicas (citosina e uracila). O RNA não é uma dupla hélice como o DNA, mas sim unifilamentar. Existe uma relação de complementariedade entre as bases contidas no DNA e no RNA; isso ocorre especialmente no momento da transcrição.

g) Localização: DNA nos cromossomos, dentro do núcleo celular, e em organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias e cloroplastos. RNA

nos cromossomos, no nucléolo e no citoplasma. O DNA e RNA são encontrados juntos em todas as células dos seres vivos, com exceção de partículas virais (acelulares), que geralmente possuem RNA ou DNA. Novos achados em 2000 indicaram a existência de vírus com ambos os materiais genéticos.

h) Replicação do DNA: antes da divisão celular, a molécula de DNA copia a si mesma, em um processo denominado replicação. Ocorrem abertura da fita dupla e duplicação de cada uma das fitas. Assim, as informações serão passadas às novas células-filhas.

## Expressão gênica

Como o DNA é transformado em proteínas? Como as informações nele contidas podem ser traduzidas em seqüência específica de aminoácidos?

A ordem dos nucleotídeos no DNA corresponde a *receitas* em um *livro de instruções*, e é denominada *código genético*:

- A célula transforma esse código em proteína, transcrevendo essas informações, por meio da cópia pelo RNA mensageiro (RNAm), utilizando-se de *palavras de três letras* denominadas códons.
- Estas *palavras* (*códons*) orientarão a seleção de determinado aminoácido.
- O *RNA transportador* carreará esses aminoácidos aos ribossomos, que, como em uma *máquina de escrever*, traduzirá em uma seqüência específica de aminoácidos.
- A *proteína* é, então, formada. (Figura 1)

a) Transcrição: ou seja, a síntese do RNA a partir do DNA ocorre a partir de um filamento molde do DNA, que orienta a formação de um filamento complementar de RNA. A síntese do RNA é catalisada por uma molécula de RNA-polimerase. A transcrição inicia-se em determinadas regiões do DNA que são chamadas de promotores. É uma pequena seqüência de nucleotídeos reconhecida por uma RNA-polimerase como o ponto ao qual deve se ligar para iniciar a transcrição. Os promotores ocorrem logo anteriormente aos genes e possuem seqüências muito similares para serem reconhecidos pela mesma enzima. A RNA-polimerase migra ao longo da molécula de

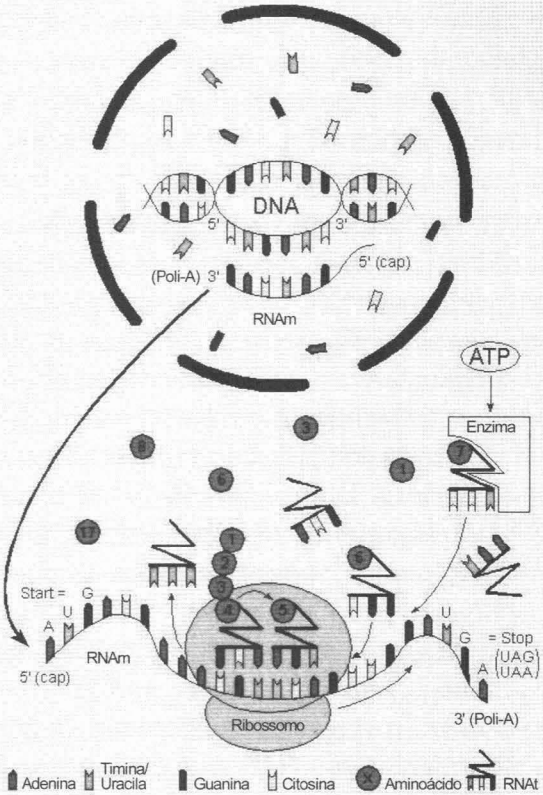



FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNTESE PROTÉICA EM EUCARIONTES.

DNA, desenrolando a dupla hélice, enquanto liga seqüencialmente ribonucleotídeos à extremidade 3′, dando início à síntese de RNA, que é sempre sintetizado no sentido 5′ para 3′. O término da cadeia a ser sintetizada também é reconhecido pela RNA-polimerase. Tal reconhecimento pode ser feito de maneira direta ou com o auxílio de um fator protéico denominado ρ (rô), necessário ao reconhecimento do sinal de término. O término da transcrição resulta na dissociação da RNA-polimerase do DNA e na liberação do RNA transcrito, que agora está pronto a desempenhar seu papel como produto final da transcrição gênica, ou como mensageiro para síntese de polipeptídeos, mediante outro processo denominado tradução.

Os genes são descontínuos, ou seja, os trechos que contêm informações biológicas (éxons) são intercalados por trechos que não as contêm (íntrons).

Os genes encontram-se interrompidos, e não são uma seqüência linear contínua. Tal descoberta constituiu uma das mais importantes da genética molecular.

Antes do advento das técnicas do DNA recombinante, a análise dos RNA transcritos sugeriam uma falta de correspondência entre o mapa genético do DNA e a molécula transcrita do RNAm. Com o aprimoramento dessas técnicas tornou-se evidente que os RNA transcritos primários eram encurtados de alguma maneira, pela eliminação de segmentos internos, antes de serem enviados ao citoplasma para a síntese protéica. Estudos em eucariontes têm mostrado que os segmentos de DNA codificadores de determinada proteína são interrompidos por seqüências intercalares denominadas de íntrons, cuja função ainda é pouco conhecida. Durante o processo de formação do RNAm, este sofre uma série de reações de corte e reunião (*splicing*), onde determinados trechos são cortados e eliminados e o restante, reunido novamente. Nesse processo os íntrons são descartados do RNAm e as regiões codificadoras de proteínas, os *éxons*, são reunidas. Assim o RNAm está pronto para ser decodificado, formado agora por uma seqüência totalmente colinear para determinada proteína.

b) Íntrons: região da molécula de DNA que não corresponde à informação biológica.

c) Éxon: regiões codificantes dos genes descontínuos.

d) *Splicing:* a transcrição produz uma cópia fiel do filamento molde do gene. Isso significa que se o gene contiver íntrons, ou seja, trechos que não contêm informações biológicas, então o transcrito primário incluirá cópias desses íntrons. Entretanto, esses íntrons precisam ser removidos, e as regiões de éxons do transcrito ligadas umas às outras, antes da tradução. Este processo de remoção de íntrons é denominado *splicing*, ou recomposição.

Qual o mecanismo que faz o corte e a reunião da molécula de RNAm antes de esta ser enviada ao citoplasma?

O modelo mais aceito hoje é o chamado modelo de alça, no qual a molécula é quebrada com a ajuda de determinadas proteínas, formando-se uma alça intermediária no corte dos transcritos primários de RNAm. Essa alça corresponde ao íntron a ser eliminado, ela será clivada em determinado ponto, e, posteriormente, as duas pontas dos éxons serão unidas, sendo a alça descartada.

Todo esse processo de formação do RNAm e do descarte dos íntrons é muito importante para a compreensão, por exemplo, das técnicas de mapeamento e seqüenciamento genômico. Sabemos que as técnicas mais utilizadas fazem o seqüenciamento do DNA, apenas sobre os éxons, as "regiões codificadoras de proteínas", descartando-se os *íntrons*. Isso não quer dizer que esses íntrons, equivocadamente denominados de "DNA-lixo", não têm função alguma. A não-inclusão dos íntrons teve apenas a finalidade prática de acelerar o seqüenciamento do DNA. A função dos íntrons ainda é pouco conhecida, mas talvez possa estar relacionada ao controle da expressão de determinados genes.

e) Tradução: com o término da transcrição, temos a formação de três tipos de RNA, os quais atuam em conjunto durante o processo da tradução. O RNAm é a cópia do DNA com todas as informações genéticas que serão agora traduzidas em proteínas. O RNAt é a molécula que transportará o aminoácido específico, durante a leitura do RNAm. E o RNAr é uma das moléculas que compõem o ribossomo, organela celular responsável pela leitura do RNA mensageiro. A tradução ou a síntese de proteínas pode ser vista como reações químicas que ocorrem entre os aminoácidos, moléculas de RNAt, o RNAm, os ribossomos, fatores protéicos adicionais, enzimas e íons inorgânicos.

f) Códon e anticódon: sabemos que o RNAt apresenta sítios específicos. O sítio que reconhece o códon do RNAm é chamado anticódon, pois suas bases são complementares à deste último.

g) *Start* códon ou inicializador: em geral o códon 5′-AUG-3′ marca a posição em que a tradução deve começar em um RNAm.

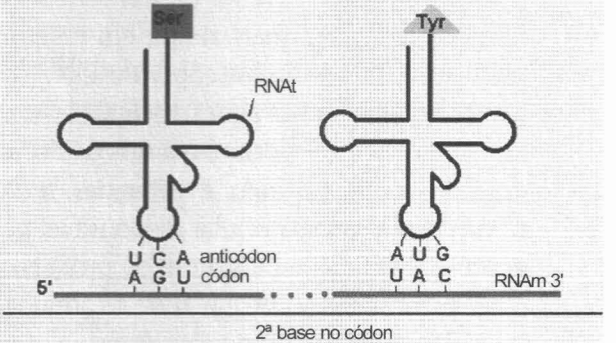
h) *Stop* códon ou finalizador: um dos três códons (5′-UAA-3′; 5′- UAG-3′; 5′-UGA-3′) no código genético que marcam a posição em que a tradução do RNAm deve ser interrompida.

Quantas letras definem um aminoácido?

Concluímos que três nucleotídeos (três *letras*) correspondem a um aminoácido. Sabemos que existem vinte aminoácidos normalmente encontrados em proteínas celulares. Se as *palavras* (aminoácidos) tiverem três letras (três nucleotídeos), aí teremos 64 palavras, mais do que o necessário para descrever os vinte aminoácidos. Assim, o código genético é dito degenerado, pois pelo excesso de palavras possíveis, ou seja, 64 trincas de nucleotídeos, concluímos que alguns aminoácidos são especificados por duas ou mais trincas diferentes (dois ou mais códons). (Figura 4)

i) Mutações por substituição de nucleotídeos: refere-se aos seus efeitos sobre a síntese de proteínas:

- *Missense* (mutação de sentido trocado): uma troca (substituição) de bases na molécula de DNA provoca uma troca do aminoácido na proteína resultante.




2ª base no códon

| 1ª base no códon | U | C | A | G | 3ª base no códon |
|---|---|---|---|---|---|
| U | Phe | Ser | Tyr | Cys | U |
| | Phe | Ser | Tyr | Cys | C |
| | Leu | Ser | STOP | STOP | A |
| | Leu | Ser | STOP | Trp | G |
| C | Leu | Pro | His | Arg | U |
| | Leu | Pro | His | Arg | C |
| | Leu | Pro | Gln | Arg | A |
| | Leu | Pro | Gln | Arg | G |
| A | Ile | Thr | Asn | Ser | U |
| | Ile | Thr | Asn | Ser | C |
| | Ile | Thr | Lys | Arg | A |
| | Met | Thr | Lys | Arg | G |
| G | Val | Ala | Asp | Gly | U |
| | Val | Ala | Asp | Gly | C |
| | Val | Ala | Glu | Gly | A |
| | Val | Ala | Glu | Gly | G |

FIGURA 4. O CÓDIGO GENÉTICO: TRADUÇÃO.

- Silenciosa: a substituição (troca) de bases no DNA não altera a seqüência de aminoácidos na proteína resultante.
- *Nonsense* (mutação sem sentido): a troca de bases no DNA provoca o aparecimento de um *stop* códon (códon finalizador), que finaliza prematuramente o processo da síntese protéica, produzindo proteínas não-funcionais.
- Mutações no processamento do RNAm: o mecanismo normal, pelo qual os íntrons são retirados do RNA não processado e os éxons unidos para formar um RNAm maduro, depende de determinadas seqüências de nucleotídeos, localizadas no sítio aceptor (íntron/éxon) e no sítio doador (éxon/íntron). As mutações podem afetar as bases necessárias no sítio doador ou aceptor da emenda, interferindo na emenda normal do RNA naquele sítio ou podem envolver substituições de bases dos íntrons, podendo criar sítios doadores ou aceptores alternativos que competem com os normais durante o processamento do RNA ("*splicing* alternativo").

***Alguns assuntos complementares indicados para melhor compreensão do texto:***

- citologia básica
- leis de Mendel
- herança genética e heredogramas
- divisão celular (meiose e mitose)
- Projeto Genoma Humano

# Teste de antiglobulina humana

3

"Coombs, Mourant e Race, após alguns anos do descobrimento dos anticorpos anti-Rh, descreveram o teste de antiglobulina (TAG), que utilizava o soro antiglobulina humana, preparado em coelhos, para detectar anticorpos Rh "incompletos". O TAG foi, então, utilizado para detectar a sensibilização *in vivo* das hemácias, ajudando o diagnóstico da doença hemolítica do recém-nascido e anemia hemolítica auto-imune. Atualmente, o TAG provavelmente seja o teste mais universalmente aplicado em imuno-hematologia..."[1]

## Introdução

Por definição, anticorpos incompletos, não aglutinantes, são aqueles que se ligam a hemácias que possuem antígenos específicos, mas não as aglutinam em meio salino. Anticorpos IgM, ditos completos (ou aglutinantes), são capazes de aglutinar hemácias nessas condições. Os anticorpos incompletos necessitam de um mecanismo artificial de produção da aglutinação, já que, por serem pequenas moléculas, não conseguem superar as forças de repulsão entre as hemácias.

---

1 G. Garratty, "Editorial", em *Transfusion*, junho de 2000.

Em 1945, Coombs, Mourant e Race demonstraram que, sensibilizando-se animais (cabras ou coelhos) com injeções de imunoglobulinas humanas, haveria produção de anticorpos contra as frações Fc dessas imunoglobulinas. Portanto, o soro de Coombs contém anticorpos antianticorpos humanos (por isso são chamados antiglobulinas humanas).

Como esses anticorpos podem reagir com qualquer imunoglobulina humana (não somente as antieritrocitárias), no teste de antiglobulina humana é necessário lavar as hemácias após a etapa de sensibilização e antes de acrescentar-se o soro de Coombs ou, melhor dizendo, o soro antiglobulinas humanas, a fim de se remover qualquer traço de soro ou plasma, deixando-as recobertas apenas com os anticorpos específicos.

## Princípio do teste

Como já foi dito, a aglutinação das hemácias ocorre quando existe uma diminuição das forças de repulsão das hemácias, ou seja, diminuição da diferença de potencial elétrico (potencial zeta) até determinado valor, denominado potencial zeta crítico.

A maioria dos anticorpos de classe IgM, quando ligados aos antígenos específicos, é capaz de diminuir essas forças de repulsão, a ponto de atingir o potencial zeta crítico e, assim, promover a aglutinação das hemácias em meio salino.

Os anticorpos de classe IgG, quando ligados aos antígenos específicos, na maioria das vezes, não diminui as forças de repulsão a ponto de atingir esse valor mínimo (potencial zeta crítico), não permitindo que as hemácias aglutinem, apesar da diminuição da diferença de potencial elétrico. Dessa forma, para podermos visualizar a reação antígeno-anticorpo utilizamos o soro antiglobulinas humanas, que diminui ainda mais o potencial zeta até o ponto crítico, promovendo assim a aglutinação. (Figura 1)

É importante ressaltar que não é somente a classe do anticorpo que determina se ele é aglutinante ou não. O número de sítios antigênicos nas hemácias pode também ser um ponto decisivo para que as hemácias aglutinem, conforme exposto no capítulo 1, no Esquema representativo do fenômeno da hemaglutinação, página 35.

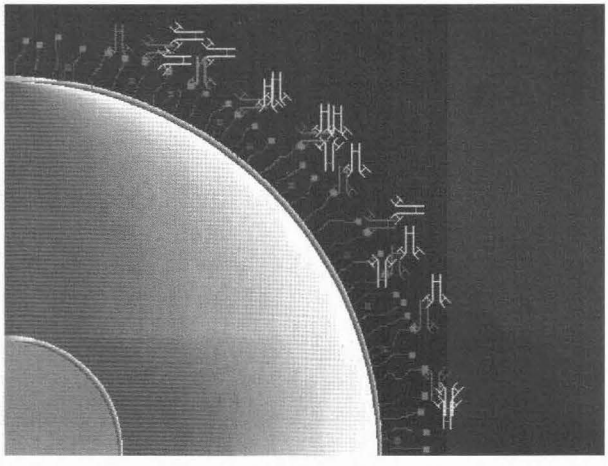


FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DA ANTIGLOBULINA HUMANA.

## Tipos de reagentes antiglobulina

Os soros antiglobulinas humanas (ou soro de Coombs) podem ser:

- Poliespecíficos: podem ser de origem policlonal, monoclonal ou mistos. Contêm anticorpos contra IgG humana e contra frações de complemento C3 (C3b e/ou C3d). Podem conter pouca atividade contra IgM e IgA. Como a maioria dos anticorpos com significado clínico é da classe IgG, a maior função do reagente é detectar a presença desses anticorpos. A detecção de frações de complemento faz-se importante em casos de testes de antiglobulina direto (ou Coombs direto), principalmente em anemia hemolítica auto-imune. São utilizados normalmente na rotina em testes de pesquisa e identificação de anticorpos, diretos ou indiretos, e em testes de compatibilidade. (Figura 2)
- Monoespecíficos: podem ser de origem policlonal ou monoclonal. São preparados especificamente contra determinada classe de Ig ou fração do complemento, como IgG, IgA, IgM, C3 ou C4. (Figura 3)

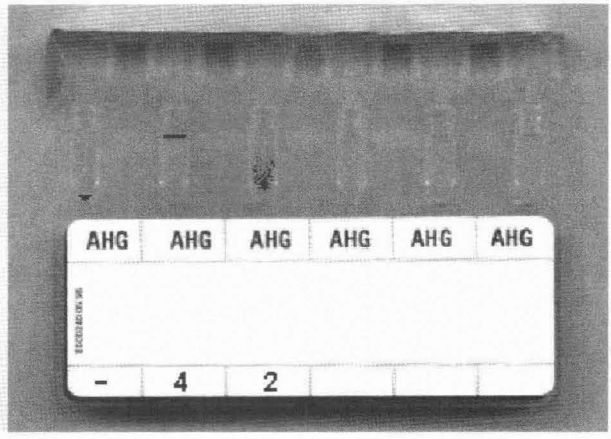



FIGURA 2. TESTE DE ANTIGLOBULINA HUMANA UTILIZANDO SORO POLIESPECÍFICO, PELO MÉTODO DE GEL-TESTE CENTRIFUGAÇÃO (CARTÃO ID-LISS/COOMBS, DIAMED AG, SUÍÇA).

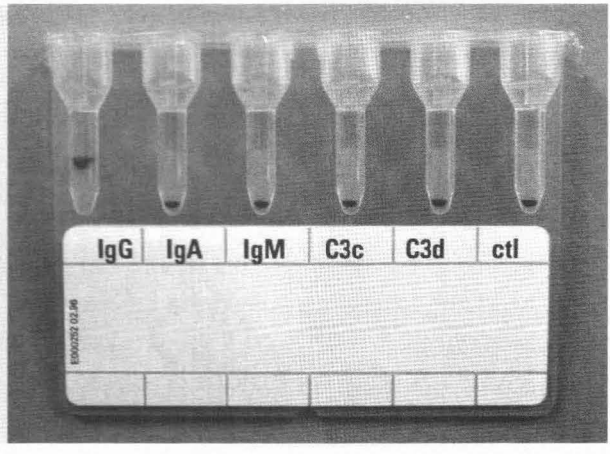



FIGURA 3. TESTE DE ANTIGLOBULINA HUMANA UTILIZANDO SOROS MONOESPECÍFICOS, PELO MÉTODO DE GEL-TESTE CENTRIFUGAÇÃO (CARTÃO ID-DC SCREENING I, DIAMED AG, SUÍÇA).

## Tipos de teste da antiglobulina humana

O teste da antiglobulina pode ser realizado de duas maneiras:

- Teste da antiglobulina indireto (TAI, PAI ou Coombs indireto): pesquisa a presença de anticorpos no soro/plasma. Esse teste é realizado para pesquisa e identificação de anticorpos irregulares e testes de compatibilidade pré-transfusional. A sensibilidade do teste pode ser aumentada por procedimentos que modificam a primeira etapa da

reação (sensibilização das hemácias), como adição de albumina ou outras macromoléculas ao meio, meios de baixa força iônica (LISS), ou tratamento enzimático (capítulo 4, "Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares").

- Teste da antiglobulina direto (TAD ou Coombs direto): pesquisa a presença de hemácias sensibilizadas por anticorpos e/ou frações de complemento. Esse teste é utilizado para estudo da doença hemolítica do recém-nascido, anemia hemolítica auto-imune, na hemólise induzida por drogas e ainda nas reações hemolíticas pós-transfusionais (capítulo 4).

## Falsos resultados no teste de antiglobulina humana

- A lavagem dos glóbulos vermelhos é um dos passos mais simples e mais importantes na realização dos testes de antiglobulina em método convencional (realizado em tubo). Se esta não for realizada de forma criteriosa, podem "sobrar" outras globulinas que estavam presentes no plasma e neutralizar o soro antiglobulina reagente, provocando falsos resultados. No método de gel-centrifugação, não é necessária a realização da lavagem, constituindo uma vantagem importante, pois eliminando-se essa etapa, minimizam-se os erros técnicos e a perda dos anticorpos de baixa afinidade, que podem eluir durante o processo. Além disso, confere maior rapidez na realização dos testes.
- O anticorpo não-aglutinante ligado à hemácia, se exposto a condições diversas das ideais em que a reação Ag×Ac ocorreu, pode eluir-se naturalmente. Por isso, não se recomenda a demora na execução das fases do teste de antiglobulina humana.
- Durante a padronização do teste de antiglobulina humana, as melhores condições para a obtenção de resultados fidedignos foram estabelecidas. Portanto, alterações aleatórias da técnica não devem ser realizadas, por ser uma prática insegura e que pode produzir falsos resultados positivos ou negativos. A leitura deste teste também deve ser realizada de forma criteriosa, pois, na maioria dos casos, temos resultados fracamente positivos que podem ser erroneamente interpretados como negativos. Nesse caso, o método de gel-

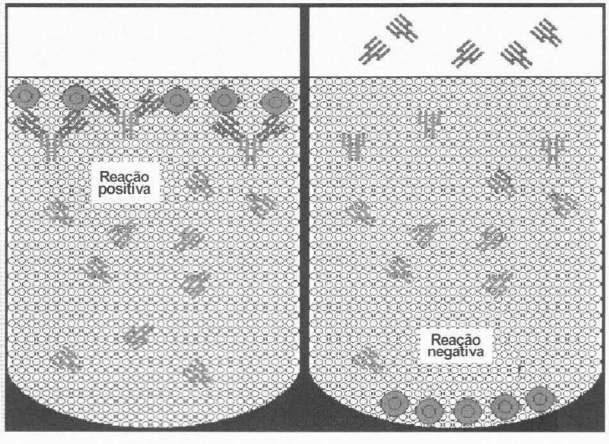



FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE TESTE DE ANTIGLOBULINA HUMANA PELO MÉTODO DE AGLUTINAÇÃO EM COLUNA (GEL-TESTE CENTRIFUGAÇÃO, DIAMED AG, SUÍÇA).

centrifugação também constitui uma importante ferramenta, pois a interpretação da leitura é objetiva e estandardizada. (Figura 4)

- Devemos nos assegurar sobre a qualidade dos reagentes empregados, uma vez que, se não estiverem adequados à preconização internacional, resultados falsos negativos podem ser produzidos. É importante a inspeção de qualidade de reagentes, inclusive cartelas para testes de gel-centrifugação.
- Podemos obter resultados positivos em teste de antiglobulina direto (TAD) realizado pelo método de gel-centrifugação e negativos em método convencional (tubo). Isso ocorre porque neste primeiro podemos detectar uma quantidade menor de moléculas de anticorpos ligadas aos glóbulos vermelhos (ver capítulo 4). Esse incremento na sensibilidade deve-se ao fato de, conforme exposto anteriormente, tratar-se de método perfeitamente estandardizado, com mínimas possibilidades de erros técnicos. Além disso, elimina-se a etapa de lavagem das hemácias, evitando a eluição de anticorpos; utiliza-se como meio diluente das hemácias-teste, potencializador de reação (LISS), o que não ocorre em tubo. No momento da interpretação dos resultados, temos leitura objetiva, permitindo com facilidade a interpretação de pequenas aglutinações (pó).
- Hemácias recobertas por complemento podem não aglutinar imediatamente com o soro antiglobulina poliespecífico, sendo necessária

em testes negativos, após a leitura imediata, a incubação por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente.

- Não devemos utilizar hemácias provenientes de coágulos para a realização do teste de antiglobulina direto (TAD), uma vez que podemos ter resultados falsos positivos por ligação *in vitro* de frações de complemento, pela presença de anticorpos frios IgM sem significado clínico no soro.
- A sub ou ultracentrifugação podem promover resultados falsos.

# Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares

4

## Introdução

Como já vimos no capítulo 1, existem muitas possibilidades de ativação da resposta imune em um indivíduo, como resultado à exposição a substâncias estranhas (imunógenos).

Em hemoterapia, a administração de concentrado de hemácias ou outro hemocomponente que possua uma grande quantidade de eritrócitos pode ser responsável pela aloimunização contra antígenos eritrocitários após transfusão.

A capacidade de estimular a resposta imune depende de muitos fatores, mas, uma vez produzidos os anticorpos, necessitamos de métodos ou testes que permitam sua detecção.

## O que são anticorpos irregulares?

Quando o indivíduo é exposto a substâncias reconhecidas como não-próprias ao seu organismo, como, por exemplo, antígenos eritrocitários, pode ocorrer ativação do sistema imune com formação de anticorpos.

Como já vimos, anticorpos são proteínas (imunoglobulinas) produzidas pelo plasmócito após ativação do sistema imune.

Podem ocorrer por estímulos naturais, como no caso da imunização ABO, que também são denominados anticorpos regulares, pois sua ocorrência é esperada. Mas, geralmente em hemoterapia, ocorrem como resposta aos aloantígenos eritrocitários contidos em hemocomponentes transfundidos. Como sua ocorrência não é esperada, denominamos de anticorpos irregulares.

Na rotina imuno-hematológica, geralmente procuramos detectar e identificar anticorpos antieritrocitários.

O grande número de genes envolvidos na produção de proteínas leva à formação de um grande número de antígenos nas hemácias dos indivíduos (diversidade antigênica). E é essa diversidade um dos fatores responsáveis pela formação dos anticorpos irregulares. (Figura 1)

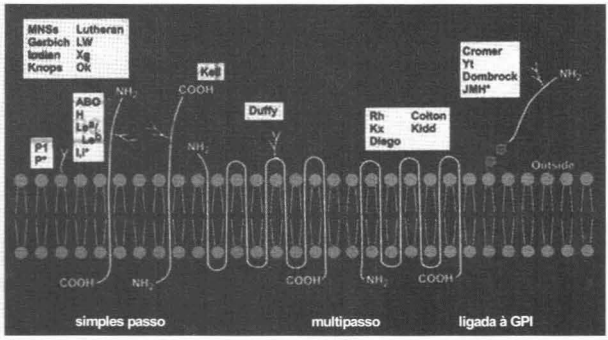



FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ANTÍGENOS DE GRUPOS SANGÜÍNEOS NA MEMBRANA ERITROCITÁRIA.

Já são conhecidos mais de 250 antígenos eritrocitários, classificados em 25 sistemas, além de 5 coleções e 16 séries.[1]

CLASSE DOS ALOANTICORPOS ERITROCITÁRIOS EM IMUNO-HEMATOLOGIA

| | |
|---|---|
| IgM | • são naturais e regulares no sistema ABO e H;<br>• são naturais e irregulares nos sistemas Lewis, P, MNS (M, N) e ABO. |
| IgG | • são imunes e irregulares nos sistemas Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS (S, s). |
| IgA | • um pequeno percentual dos anticorpos ABO são de classe IgA. |

Os anticorpos irregulares ocorrem em aproximadamente 0,3% a 2,0% da população em geral. O risco de aloimunização é de aproximadamente

[1] Segundo dados da ISBT, 2000.

1% por unidade transfundida. Em determinadas populações, porém, esse risco é maior, sendo estimado em:

- Politransfundidos: 9%
- Falciformes: 36%
- Talassêmicos: 10%[2]

Podem ser encontrados no soro/plasma dos indivíduos ou ligados à membrana eritrocitária.

Ocorrem principalmente por sensibilização após transfusão, gestação, ou, ainda, podem ser de ocorrência natural.

Lembrando:

- Aloanticorpos são anticorpos formados por sensibilização contra antígenos reconhecidos como "não-próprios" ao indivíduo.
- Auto-anticorpos: formados contra antígenos próprios aos indivíduos (auto-imune). Podem ser frios, quentes ou induzidos por drogas.

Alguns testes imuno-hematológicos permitem a detecção dos anticorpos irregulares.

TESTES PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IRREGULARES

| Séricos | Ligados à membrana eritrocitária |
|---|---|
| Pesquisa de anticorpos irregulares | Teste de antiglobulina direto |
| Testes de compatibilidade | Autocontrole |
| Tipagem reversa | Controle de Rh |

## ANTICORPOS SÉRICOS

### *Pesquisa de anticorpos irregulares*

Verifica a presença ou não de anticorpos irregulares no soro/plasma do indivíduo. É um dos testes pré-transfusionais obrigatórios, segundo portaria 1.376/93 MS, e pode ser realizado também para detecção de anticorpos irregulares em doadores ou gestantes. Utiliza pelo menos dois frascos de reagentes comerciais, que são células do tipo O, e que possuem a maioria

[2] P. D. Issit & D. J. Anstee. *Applied Blood Group Serology* (4ª ed., Durham: Montgomery Scientific, 1999).

dos outros antígenos (que não ABO) de grupos sangüíneos. É realizado colocando-se essas hemácias em contato com o soro/plasma do indivíduo.

A leitura da reação pode ser feita em diversas fases, dependendo da metodologia escolhida.

No caso do método convencional (em tubo), realizamos geralmente três leituras da aglutinação:

- Fase de temperatura ambiente.
- 37 °C.
- Fase da antiglobulina humana.

Dependendo do potencializador de reação utilizado, podemos ter a supressão de determinada fase:

- Utilizando-se PEG, não é realizada leitura a 37 °C.

  Pelo método de aglutinação em coluna, normalmente a leitura é realizada diretamente na fase de antiglobulina humana.

Interpretação dos resultados: resultado positivo em qualquer uma das fases indica presença de anticorpos irregulares, que podem ser identificados por meio de painel de hemácias. (Figura 2)

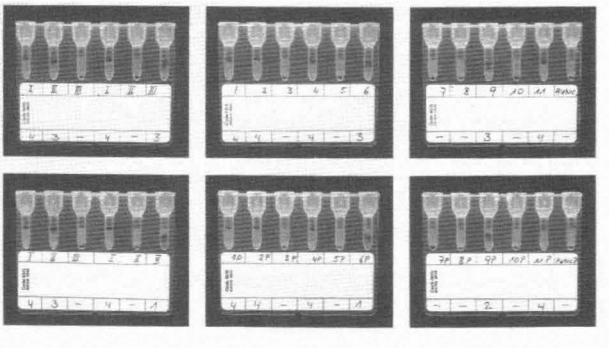


FIGURA 2. PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IRREGULARES PELO MÉTODO DE GEL-TESTE CENTRIFUGAÇÃO (DIAMED AG, SUÍÇA).

### *Prova cruzada maior*

É um teste pré-transfusional que verifica reação *in vitro* entre o soro/plasma do receptor e as hemácias do doador. Deve ser realizado nas fases sugeridas para cada método (convencional ou gel-teste). Os anticorpos reativos em fase de antiglobulina humana são, potencialmente, de importância clínica.

Prova positiva indica provável presença de anticorpo no receptor reagindo contra antígeno das hemácias do doador, fenotipagem ABO do doador incompatível com a do receptor, ou presença de anticorpo irregular adsorvido às hemácias do doador. (Figura 3)

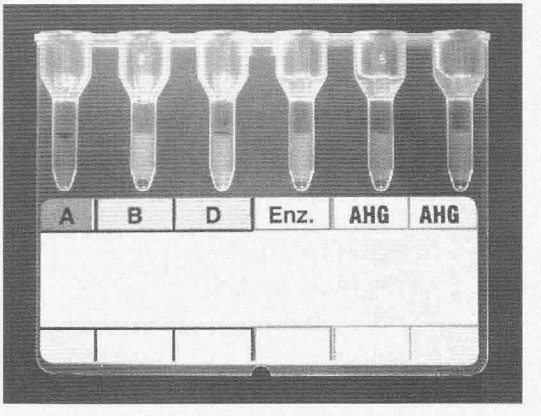



FIGURA 3. PROVA DE COMPATIBILIDADE PELO MÉTODO DE GEL-TESTE CENTRIFUGAÇÃO (DIAMED AG, SUÍÇA).

### *Prova reversa da fenotipagem ABO*

Teste confirmatório da prova direta da fenotipagem ABO, realizada adicionando-se soro/plasma do indivíduo a ser testado, com suspensão de hemácias comerciais de tipos sangüíneos $A_1$ e B. Podemos utilizar também hemácia de tipo $A_2$, para detecção do anticorpo anti-$A_1$.

Em algumas discrepâncias entre as provas direta e reversa, podemos suspeitar da presença de anticorpos irregulares, como, por exemplo, anticorpo anti-$A_1$, freqüentemente encontrado no soro de alguns indivíduos de fenótipo $A_{subgrupo}$. (Figura 4)

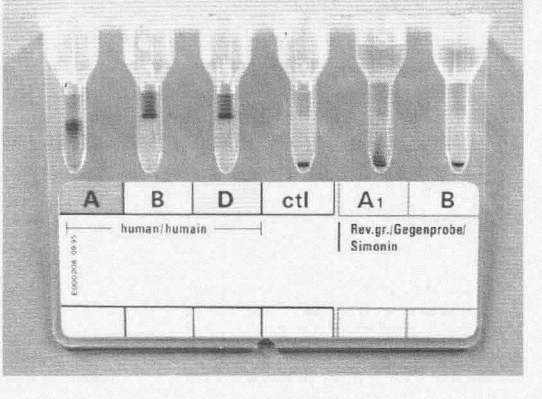



FIGURA 4. DISCREPÂNCIA NA DETERMINAÇÃO ABO PELO MÉTODO DE GEL-TESTE CENTRIFUGAÇÃO (DIAMED AG, SUÍÇA).

Discrepâncias nas classificações ABO são geralmente causadas por:

- anticorpos fracos ou ausentes;
- anticorpos irregulares (conforme exemplo acima);
- antígenos extras;
- antígenos ABO fracos ou ausentes.

## Anticorpos ligados às hemácias

### *Autocontrole*

É um teste pré-transfusional obrigatório (Portaria nº 1.376/93 MS). É feito adicionando-se suspensão de hemácias de um indivíduo ao seu próprio soro/plasma. As leituras são realizadas nas fases preconizadas para cada método.

Interpretação dos resultados: quando positivo, pode indicar presença de auto-anticorpos frios ou quentes, reações transfusionais hemolíticas, ou ainda disproteinemias (*rouleaux*).

### *Teste de antiglobulina direto (TAD)*

É realizado adicionando-se reagente antiglobulina humana à suspensão de hemácias-teste lavadas. É indicado na detecção de anticorpos não aglutinantes (classe IgG) ligados às hemácias. Pode ser realizado por método em tubo ou reação em coluna, com soros antiglobulinas humanas: monoespecífico (IgG) ou poliespecífico. Muitos trabalhos mostram que esse teste tem sensibilidade limitada, sendo o método de aglutinação em coluna mais sensível que o método convencional (tubo) na detecção dos anticorpos.[3]

---

[3] A. Alvarez *et al.*, "A Relative Sensitivity of Direct Antiglobulin Test, Antibody's Elution and Flow Citometry in the Serologic Diagnosis of Immune Hemolytic Transfusion Reactions", em *Haematologica*, 85(2), 2000; E. Biagi *et al.*, "A Persistent Severe Autoimmune Hemolytic Anemia Despite Apparent Direct Antiglobulin Test Negativization", em *Haematologica*, 84(11), 1999; I. Bromilow, *Gel Test and HDN Investigations* (Liverpool: Meesey Reg. Transfusion Center); F. Ghilardi *et al.*, "Análise clínica laboratorial na sensibilização eritrocitária perinatal com a realização de estudo imuno-hematológico pela gel-centrifugação", em *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 17(170), 1995; H. Hustinix *et al.*, "Evolution of Gel Test and Comparation With Other Antiglobulin Techniques", em *Simposio of New Techniques in Blood Grouping Serology*, 1990; O. Nathalang, "Comparison between the Conventional Tube Technique and the Gel Technique in Direct Antiglobulin Tests", em *Vox Sanguinis*, nº 72, 1997; J. D. Tissot *et al.*, "The Direct Antiglobulin Test: Still a Place for the Tube Technique?", em *Vox Sanguinis*, nº 77, 1999.

Interpretação dos resultados: quando positivo, pode indicar a presença de auto-anticorpos (anemia hemolítica auto-imune ou induzida por drogas) ou aloanticorpos do paciente fixados nas hemácias da bolsa transfundida ou, ainda, anticorpo materno transferido a feto (DHRN).

LIMITAÇÕES DO TESTE

Sensibilidade TAD em tubo é estimada em:

- 200-500 moléculas de IgG/hemácia
- 400-1.100 moléculas de C3d /hemácia

Fonte: American Association of Blood Banks. *Technical Manual*, Bethesda, Maryland: AABB, 2000.

### *Controle de Rh*

Serve para "validar" a fenotipagem Rh(D). O soro controle de Rh é comercialmente adquirido e é composto do mesmo meio diluente do soro anti-D, exceto anticorpos. Portanto, na rotina devemos utilizar ambos de mesma procedência ou origem.

Interpretação dos resultados: quando positivo, indica a provável presença de anticorpos ligados à hemácia.

## Algoritmo em caso de PAI positivo

Quando detectamos a presença de anticorpos irregulares, o próximo passo é identificar a especificidade do(s) anticorpo(s), utilizando painel de hemácias contendo de 8 a 30 hemácias-teste de grupo O e fenótipos conhecidos nos sistemas imunogênicos, em concentrações variando de 0,8% a 5%, de acordo com o método empregado. Recomenda-se, caso necessário, o uso de hemácia-teste de cordão umbilical ou hemácia-teste de adulto com fenótipo I-negativo. As hemácias do painel são testadas contra o soro ou plasma do indivíduo, utilizando-se as mesmas técnicas que apresentaram PAI positivo. É necessário confirmar a especificidade do anticorpo suspeito com pelo menos três hemácias negativas e positivas para o antígeno correspondente. Acrescentar ao painel um autocontrole (Ac), para detectar possíveis auto-anticorpos. O painel de hemácias vem acompanhado de um

diagrama com o fenótipo dos antígenos "mais importantes" em bancos de sangue.

Identificado o anticorpo, determinar seu significado clínico, avaliando:

- temperatura de reação;
- potência (grau de reatividade);
- classe da Imunoglobulina;
- subclasse da IgG;[4]
- capacidade de ativação do complemento.

Geralmente, anticorpo clinicamente significativo é reativo a 37 °C e/ou fase de AGH. Portanto, são anticorpos de classe IgG ou IgM de grande amplitude térmica.

| IMPORTÂNCIA TRANSFUSIONAL DOS ANTICORPOS IRREGULARES |
|---|
| Clinicamente significantes:<br>• geralmente reativos a 37 °C, causam reações transfusionais hemolíticas;<br>• ABO, Rh, K, Fy, Jk, SsU, Di. |
| Importantes se reativos a 37 °C<br>• Le, M, N, $P_1$, Lu. |
| Benignos<br>• Chido, Rodgers, Bg, JMH, $Kn^a$, $McC^a$, HTLA. |
| Variável<br>• Vel, Ge, $Yt^a$, $Xg^a$, Do, Sc, Co. |

Realizar contraprova para o antígeno correspondente: fenotipar a hemácia do paciente para o antígeno correspondente ao anticorpo identificado. Ex.: se detectarmos a existência de aloanticorpo de especificidade anti-K (K1), a hemácia do indivíduo deve ser fenótipo K negativo.

[4] Verificação de subclasse de IgG é indicada para avaliação do possível grau de hemólise, mas esse teste ainda é indisponível na rotina sorológica, sendo possível apenas por testes mais sofisticados, como, por exemplo, citometria de fluxo.

Quando o anticorpo for clinicamente significativo, e houver necessidade de transfusão: selecionar sangue fenótipo-compatível para o receptor (fenotipagem da bolsa para o antígeno em questão). Ex.: no mesmo exemplo anteriormente apresentado, fenotipar a bolsa que apresentou prova de compatibilidade negativa para o antígeno K (K1).

Para melhor caracterização, recomenda-se, ainda, observar informações como idade, sexo, raça, diagnóstico do paciente, histórico transfusional e registros anteriores em outros bancos de sangue já utilizados pelo paciente.

Lembretes:

- Provas de compatibilidade negativas nem sempre significam ausência de anticorpo irregular na amostra-teste, pois o título desse anticorpo pode ter decrescido até atingir níveis indetectáveis, por diminuição do estímulo antigênico, ou, ainda, pelo teste empregado não apresentar sensibilidade suficiente para a detecção. Nesse caso, se houver novo estímulo antigênico, por meio de nova transfusão fenótipo-positiva, pode ocorrer resposta anamnéstica, com produção de altos títulos desses anticorpos em período de 48 a 72 horas, e estímulo de reação transfusional de caráter imunológico. Portanto, é importante pesquisar a história transfusional de pacientes, se possível recuperando as informações sobre anticorpos preexistentes, e/ou até mesmo fornecendo bolsas fenotipadas, especialmente levando-se em conta os antígenos mais imunogênicos, como os do sistema Rh (D, C, c, E, e), Kell (K1), Kidd ($Jk^a$ e $Jk^b$) e Duffy ($Fy^a$ e $Fy^b$).
- É importante a interpretação correta da intensidade de aglutinação que, tanto na detecção como na identificação de anticorpos, direciona e fornece dados significativos para identificação. A seguir é apresentada uma sugestão de padronização de leitura de intensidade de aglutinação, para testes realizados pelo método convencional (em tubo). Para interpretação de intensidade de aglutinação em gel-teste. (Figura 5)

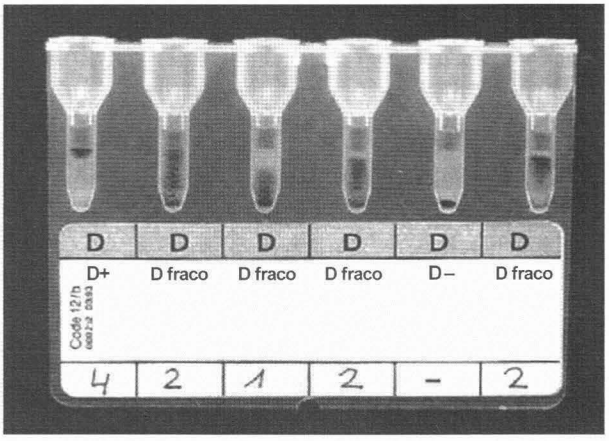



FIGURA 5. GRADUAÇÃO DAS INTENSIDADES DE AGLUTINAÇÃO REPRESENTADA NA FENOTIPAGEM PARA ANTÍGENO RH(D) NO MÉTODO DE GEL-TESTE CENTRIFUGAÇÃO (DIAMED AG, SUÍÇA).

TABELA PARA INTERPRETAÇÃO DO GRAU DE INTENSIDADE DAS REAÇÕES DE AGLUTINAÇÃO PELO MÉTODO EM TUBO

| Grau da intensidade da reação | Interpretação | escore |
|---|---|---|
| 4+ | botão sólido/nenhuma célula livre, fundo transparente | 12 |
| 3+ | alguns aglutinados grandes mas separados; fundo límpido, transparente | 10 |
| 2+ | aglutinados maiores e menores; sobrenadante róseo | 8 |
| 1+ | aglutinados pequenos, mesmo tamanho; sobrenadante avermelhado | 5 |
| w | vários aglutinados pequenos; sobrenadante muito avermelhado | 3 |

Fonte: American Association of Blood Banks. *Technical Manual*, cit.

## Algoritmo em caso de TAD positivo

- Inicialmente, determinar a classe do anticorpo adsorvido às hemácias, pela utilização de soros antiglobulinas humanas monoespecíficos e, se possível, anticomplemento.
- Se o anticorpo for classe IgG, removê-lo da membrana, por técnicas de eluição. Existem vários métodos para eluição dos anticorpos, como os que utilizam solventes orgânicos, como éter ou clorofórmio; os que utilizam soluções que alteram o pH, como glicina ácida (princípio dos principais *kits* comerciais de eluição); e os que promovem

hemólise por alteração da temperatura, como congelamento (LUI) ou ainda aquecimento.

- Realizar a identificação dos anticorpos presentes no eluato, pela utilização do painel de hemácias como descrito anteriormente para o soro e/ou plasma.
- Se necessário, proceder a titulação dos anticorpos.

E se, após a realização do painel, não for possível determinar a especificidade do(s) anticorpo(s)?

## Alguns procedimentos auxiliares em identificação de anticorpos irregulares

A sensibilidade do teste de antiglobulina indireto pode ser melhorada por procedimentos que modificam a primeira etapa da reação, ou seja, a fixação dos anticorpos durante a incubação. Podemos alterar os procedimentos-padrão, ou mesmo adicionar substâncias potencializadoras ao meio.

### Técnica enzimática

Alguns anticorpos têm suas reatividades aumentadas pelo tratamento enzimático das hemácias-teste. Alguns antígenos eritrocitários são destruídos ou tornam-se pouco reativos. As enzimas retiram da superfície da hemácia fragmentos polipeptídicos de glicoproteínas membranares, diminuindo o potencial zeta e aumentando a afinidade do anticorpo, por uma reestruturação na distribuição dos antígenos. As enzimas proteolíticas mais utilizadas em testes sorológicos são: bromelina, papaína, ficina e tripsina.

Especialmente indicado como método acessório de identificação, em casos de misturas de anticorpos, ou mesmo em caso de anticorpos importantes clinicamente, mas em baixos títulos, e que podem ter sua afinidade aumentada pela utilização de hemácias tratadas por enzimas. Como desvantagem, podemos citar a exacerbação da reatividade de anticorpos sem importância clínica, pela exposição de determinantes antigênicos residuais.

- Reatividade aumentada: anticorpos dirigidos contra antígenos dos sistemas Rh, Kidd, Lewis, P.

- Reatividade diminuída ou suprimida: anticorpos dirigidos contra antígenos dos sistemas MNS, Duffy ($Fy^a$ e $Fy^b$) e Xg.

### Preaquecimento

Para se evitar reações indesejadas por anticorpos frios na fase de antiglobulina, pode-se preaquecer as hemácias, o soro e/ou plasma e materiais utilizados para execução do teste (tubos, ponteiras, solução fisiológica, cartelas gel-teste etc.). A utilização de soro de antiglobulina humana monoespecífico anti-IgG, em vez do poliespecífico, pode evitar a interferência de frações de complemento adsorvidas.

### Redução de temperatura

Anticorpos frios, que reagem fracamente à temperatura ambiente, poderão ter sua reatividade aumentada se o teste for realizado a 4 °C. Aconselha-se inclusão de autocontrole ao painel de identificação para detecção de autocrioaglutininas.

### *Low Ionic Strenght Solution* (LISS)

O LISS age diminuindo a força iônica do meio, aumentando a acessibilidade do anticorpo à membrana eritrocitária. Outra grande vantagem é a diminuição do tempo de incubação, aliada ao aumento de sensibilidade do teste. Alguns autores relatam casos de anti-Kell (K1) não identificados com a utilização de alguns desses reagentes.

### Reagentes thiol (2-mercaptoetanol ou DTT)

Clivam as pontes dissulfídicas de moléculas protéicas. É recomendado seu uso para:

- determinar a classe do anticorpo no soro;
- dissociar anticorpos IgM adsorvidos às hemácias (Ex.: autocrioaglutinina potente);
- identificar especificidades em caso de mistura de anticorpos IgM + IgG;

- dissociar anticorpos IgG adsorvidos às hemácias, utilizando mistura de DTT e enzimas (ZZAP);
- destruir alguns antígenos eritrocitários, como Kell, Dombrock, Cartwright, quando assim for necessário, para identificação de anticorpos no soro.

## Substâncias macromoleculares: albumina, dextran, ficol, PEG

Essas moléculas aumentam a constante dielétrica do meio, diminuindo o potencial zeta (pois se polarizam no campo elétrico da hemácia e diminuem a força de repulsão entre elas), favorecendo a aglutinação. A albumina (20% a 30%) e o PEG são os meios mais utilizados para testes em tubo, propiciando diminuição no tempo de incubação e aumento na sensibilidade do teste. Mas existe o inconveniente de reações falso-positivas (segundo trabalhos, cerca de 1% dos casos), pelo excesso de polímeros, causando panaglutinação. Já existem reagentes comerciais que associam o PEG com o LISS.

## Adsorção

Pode-se remover um anticorpo do soro pela adsorção com hemácias que possuam o antígeno correspondente. Posteriormente, podem-se realizar eluição e identificação do referido anticorpo.

Muito útil na separação de anticorpos em caso de misturas, quando um deles já tenha sido identificado e esteja prejudicando a identificação dos demais.

Também pode-se confirmar a presença de determinado antígeno na hemácia pela capacidade de remover um anticorpo específico do soro ou detectar antígenos ou anticorpos fracos. Podemos realizar adsorções a quente ou a frio; alo ou auto-adsorções, dependendo do objetivo do procedimento.

## Alteração do pH

Pequenas modificações de pH têm pouca ou nenhuma influência sobre a reatividade dos anticorpos. Algumas amostras de anti-M mostraram-se melhor reagentes quando em pH 6,5. Essa diminuição pode ser obtida adicionando-se HCl. Modificações extremas de pH podem inibir a reação antígeno-anticorpo.

# Sistemas ABO (ABO 001) e Hh (H 018)

5

## Introdução

O sistema ABO foi descoberto em 1900 por Landsteiner. Em 1902, Von de Castello e Sturli descobriram o grupo AB. Nesses experimentos, verificou-se que ocorria uma aglutinação dos glóbulos vermelhos devido à fixação de anticorpos aos antígenos específicos localizados na membrana.

Classificado por um grupo de pesquisadores da ISBT[1], o Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens como sistema 001, e seus antígenos A (ABO1), B (ABO2), AB (ABO3). O *locus* ABO encontra-se no braço longo do cromossomo 9 (9q34.1-q34.2), autossômico.

Esse sistema deve ser estudado com seus associados Hh (H) e Lewis (LE), uma vez que os antígenos têm a mesma origem bioquímica: são moléculas complexas presentes nos glicolipídios e glicoproteínas membranares de diversos tecidos, além das hemácias. As células da mucosa salivar também fabricam substâncias ABO, H e Lewis solúveis.

O sistema Hh (H) é classificado pela nomenclatura ISBT como 018. Possui um único antígeno H (H1). O gene que codifica o antígeno (FUT1) está localizado no cromossomo 19q13.

---

[1] International Society of Blood Transfusion ou Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (SITS).

As características do sistema Lewis (LE) serão estudadas oportunamente, no capítulo 7, que trata de outros sistemas de grupos sangüíneos. Neste capítulo, abordaremos apenas a biossíntese dos antígenos desse sistema. O gene (*FUT3*) que codifica a glicosiltransferase está localizado no cromossomo 19p13.3.

Os antígenos do sistema ABO são produtos secundários dos genes *ABO*. Os produtos primários são enzimas (glicosiltransferases) capazes de adicionar carboidratos sobre uma estrutura precursora da membrana da hemácia.

O sistema ABO é o mais importante na prática transfusional: como primeira e mais importante regra, nunca se deve transfundir sangue contendo um antígeno ABO ao receptor que não o possua, devido à presença de anticorpos naturais e regulares em seu plasma. A reação hemolítica será intravascular, seguida de alterações imunológicas e bioquímicas, podendo ser fatal.

## Fenótipos ABO

A classificação dos fenótipos ABO eritrocitários correspondem a presença e/ou ausência dos antígenos A e/ou B na membrana da hemácia. Os indivíduos, por um mecanismo que será explicado mais adiante, formam naturalmente anticorpos contra os antígenos que não possuem. Esses anticorpos podem ser detectados no soro e/ou plasma. Portanto, para determinação do fenótipo ABO, recomenda-se pesquisar os antígenos (prova direta) e os anticorpos (prova reversa).

Pode-se concluir que a cada antígeno presente na hemácia corresponde um anticorpo no soro e/ou plasma, de especificidade contra o antígeno que o indivíduo não possui, conforme tabela a seguir:

| Grupo ABO | Antígeno ABO (hemácia) | Anticorpos (soro e/ou plasma) | Genótipos possíveis |
|---|---|---|---|
| O | nenhum | anti-A, -B e -AB | *OO* |
| $A_1$ | $A_1$ | anti-B | $A^1A^1$; $A^1A^2$; $A^1O$ |
| B | B | anti-A | *BB; BO* |
| $A_1B$ | $A_1$ e B | nenhum | $A^1B$ |
| $A_2$ | $A_2$ | anti-B; eventual anti-$A_1$ | $A^2A^2$; $A^2O$ |
| $A_2B$ | $A_2$ e B | nenhum; eventual anti-$A_1$ | $A^2B$ |

## Herança genética ABO

Foi descrita pela primeira vez por Epstein e Ottenberg, em 1910, e posteriormente por Bernstein, em 1924.

Comprovou-se que cada indivíduo herda um gene *ABO* de cada progenitor e que esses genes determinam quais antígenos ABO estarão presentes sobre a membrana do eritrócito, segundo as leis de Mendel.

- Uma posição (ou *locus*) em cada cromossomo novo é ocupada por um gene *A*, *B* ou *O*. O *locus* ABO encontra-se no braço longo do *cromossomo 9*, autossômico.
- Os genes *A*, *B* e *O* têm relação de codominância. Isso significa que os dois herdados se expressam igualmente.
- O gene *O* é considerado silencioso, pois nenhum antígeno detectável é produzido em herança desse gene. A enzima produzida é não-funcional, não adicionando carboidratos à estrutura H.

## Biossíntese dos antígenos

Os antígenos ABO, H e Lewis podem estar presentes em secreções e outros fluidos (saliva, lágrimas, urina, sucos digestivos, leite e líquido amniótico), tecidos epiteliais, órgãos como medula óssea e rins, linfócitos e plaquetas. Por isso, são considerados antígenos de histocompatibilidade.

Os processos de síntese dos antígenos ABO, H e Lewis ocorrem de maneiras diferentes nos eritroblastos (precursores das hemácias) e em células de outros tecidos, devido a diferenças estruturais das substâncias precursoras.

Os genes dos sistemas ABO, Hh e LE são correlatos, mas independentes. Não codificam diretamente a produção dos antígenos, mas produzem enzimas (glicosiltransferases) que acrescentam carboidratos a uma substância precursora básica. (Figura 1)

### Biossíntese dos antígenos ABO e H no eritroblasto

- A expressão dos genes *ABO* depende da ação de outro gene, o gene *H (FUT1)*, localizado no cromossomo 19. Apesar disso, a herança genética não depende da herança ABO.

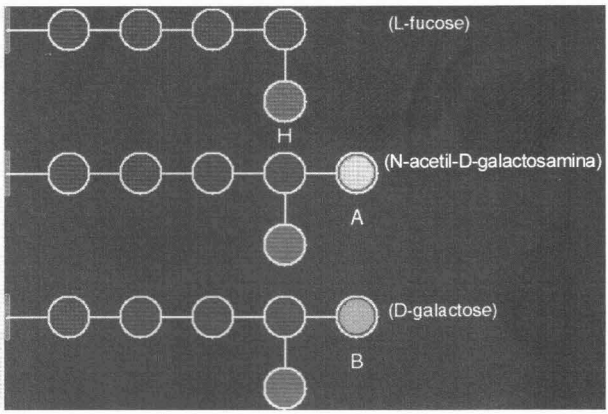
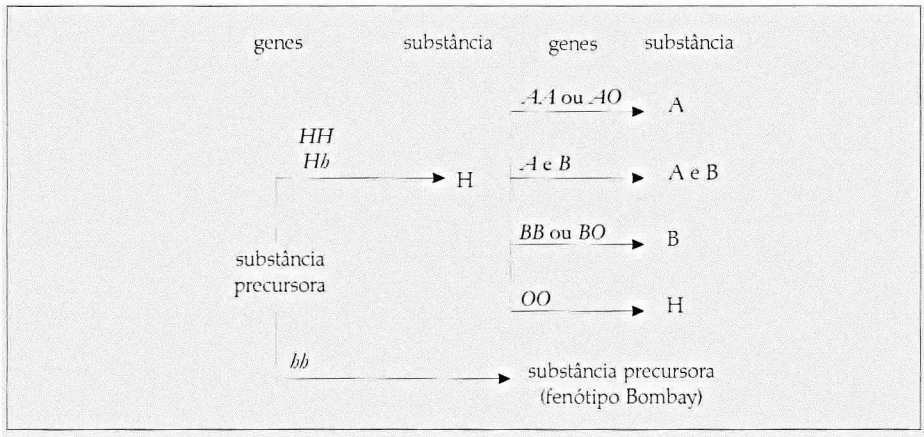



FIGURA 1. ESTRUTURA BIOQUÍMICA DOS ANTÍGENOS ABO.

- Este gene *H* apresenta-se em 99,99% da população (isótipo) sob a forma homozigota *HH* ou heterozigota *Hh*. A forma *hh* é rara e dá origem ao fenótipo conhecido como *Bombay*.

  O fenótipo Bombay clássico é produzido pelos indivíduos *hh/sese* (não secretores). Não apresentam antígenos ABO e H nem nos eritrócitos, nem em substâncias solúveis. Nesses indivíduos, encontraremos no soro e/ou plasma anticorpos anti-H, reativos à 37 °C e hemolíticos, portanto, importantes transfusionalmente.
- O gene Lewis (*FUT3*) não é ativo no eritroblasto. Portanto, os glicolipídios Lewis presentes na membrana eritrocitária, são sintetizados fora dele e posteriormente adsorvidos à membrana. Como já dissemos, neste capítulo discutiremos apenas a biossíntese dos antígenos desse sistema, e em capítulo específico, as características dos antígenos e/ou anticorpos e importância clínica e transfusional.
- O conceito atual da produção das substâncias A e B a partir de H baseia-se nas observações de Watkins, Morgan e Ceppelin.




Vejamos a seguir, mais detalhadamente, como ocorre a biossíntese dos antígenos ABO e H nos eritroblastos.

- Apenas um tipo de cadeia precursora é produzido nos eritroblastos, denominado tipo 2 (definida pela presença de ligações 1-4 entre a galactose (Gal β) e N-acetil-glucosamina (GlcNac).

Substância precursora ⟶ Gal β (1-4) GlcNac...

*Esquema da biossíntese nos eritroblastos*

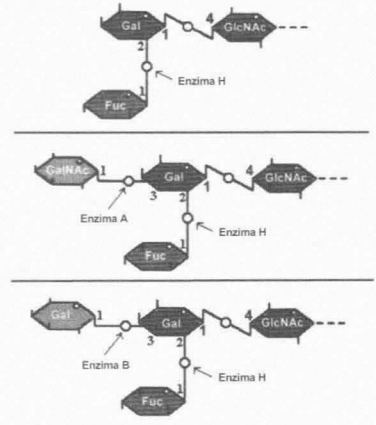



FIGURA 2. BIOSSÍNTESE DOS ANTÍGENOS ABO E H NOS ERITROBLASTOS.

- A partir desta, o gene *H*, através de sua enzima 2-alfa-fucosiltransferase, adiciona uma fucose à terminação do carbono 2 da galactose.

gene H ⟶ fucose ⟶ antígeno H ⟶ Gal β (1-4) GlcNac...
2
(Mn2+)
|
1
|
Fuc

O gene *O* produz uma enzima não-funcional, e nenhum açúcar é adicionado ao antígeno H. Temos, portanto, nas hemácias dos indivíduos do grupo O, apenas a estrutura H.

- E a partir do antígeno H, com a expressão dos genes *ABO*, podemos ainda ter:

gene A ⟶ N-acetil-galactosamina ⟶ antígeno A ⟶ GalNac 1-3 Gal β (1-4) GlcNac...
(Mn2+) 2
(Mn2+)
|
1
|
Fuc

gene B ⟶ galactose ⟶ antígeno B ⟶ Gal 1-3 Gal β (1-4) GlcNac...
(Mn2+) 2
(Mn2+)
|
1
|
Fuc

Portanto:

Os antígenos dos sistemas ABO e H são carboidratos e, assim, não são produtos primários dos genes que controlam sua expressão. Estes produzem glicosiltransferases (enzimas), que transportam açúcares, adicionando-os a uma substância precursora da membrana da hemácia.

- Gene *H* → glicosiltransferase H → 2-alfa-fucosiltransferase → adiciona fucose à substância precursora → antígeno H
- Gene *A* → glicosiltransferase A → N-acetil-galactosaminiltransferase → adiciona N-acetilgalactosamina ao antígeno H → antígeno A
- Gene *B* → glicosiltransferase B → galactosiltransferase → adiciona galactose ao antígeno H → antígeno B

*Considerações*

- O gene *A*[1] produz concentrações elevadas de enzima $A_1$, convertendo grande quantidade de antígeno H em antígeno $A_1$ (entre 810.000 e 1.170.000 sítios).
- O gene *B* converte, em média, 600 mil a 830 mil sítios de antígeno H em antígeno B.
- O gene *O* é silencioso; produz enzima não-funcional e, portanto, não modifica o antígeno H, não acrescentando nenhum carboidrato.
- O antígeno H pode apresentar-se na membrana eritrocitária, em cadeias de quatro tipos diferentes: H1 e H2 (lineares), H3 e H4 (ramificadas).
- Recém-nascidos apresentam, principalmente, cadeias H tipo 1 e 2 (lineares). Além disso, apresentam o antígeno i. Adultos apresentam em geral cadeias tipo 3 e 4 (ramificadas), e antígeno I. Os antígenos i e I são precursores das cadeias H.
- A quantidade de antígeno H nos eritrócitos varia de acordo com o grupo ABO. O grupo O é composto somente de antígeno H. A seguir, temos por ordem decrescente: O > A2 > B > A2B > A1 > A1B.
- Os fenótipos eritrocitários Hnull são de indivíduos *hh*, como já descrevemos anteriormente. Se forem, também, não secretores (*sese*), teremos o fenótipo Bombay clássico.
- A freqüência dos grupos ABO varia de acordo com raça e população estudada. Algumas explicações foram dadas a esse fenômeno, como migração populacional, cruzamentos étnicos e doenças que conferem vantagens ou desvantagens a certos grupos sangüíneos. Exemplos:
  - indígenas sul-americanos: 100% O;
  - aborígenes australianos: 50% $A_1$; 50% O.

Os antígenos ABO e H estão expressos nos precursores eritróides desde a 5ª ou 6ª semana de vida intra-uterina, embora ao nascer apresentem um menor número de sítios antigênicos que os adultos (aproximadamente

1/3 dos sítios antigênicos totais de A/B). A expressão plena desses antígenos é alcançada entre 2 e 4 anos de idade.[2]

## Biossíntese dos antígenos ABO, H e Lewis solúveis

- Relembrando: os antígenos ABO, H e Lewis podem estar presentes em secreções e outros fluidos (saliva, lágrimas, urina, sucos digestivos, leite, líquido amniótico), tecidos epiteliais, órgãos como medula óssea e rins, linfócitos e plaquetas. Por isso, são considerados antígenos de histocompatibilidade.
- As glicoproteínas dos líquidos biológicos, como saliva, por exemplo, constituem a melhor maneira de análise dessas substâncias.
- Glicosiltransferases são produzidas a partir dos genes específicos *ABO, H* e *Lewis*.
- A expressão dos genes é controlada por um outro par de genes alelos denominados secretores (*Se/se*). Esses genes não são ativos nos eritroblastos.
- O gene secretor (*FUT2*) é responsável pela formação de uma enzima 2-alfa-fucosiltransferase, que adicionará uma fucose à substância precursora, produzindo o antígeno H solúvel (que é imprescindível também para a formação dos antígenos A e B nas células secretoras). Essa enzima é ativa sobre cadeias precursoras dos tipos 1 e 2.
- Os indivíduos *sese* são chamados "não-secretores". O gene secretor não interfere na formação de antígenos ABO e H nos eritroblastos. Indivíduos não-secretores terão expressão normal dos antígenos ABO e H nos eritrócitos.
- Cerca de 80% da população caucasóide é constituída de indivíduos secretores.
- O gene *secretor* é também importante na formação dos fenótipos Lewis.

---

[2] P. L. Molisson et al., *Blood Transfusion in Clinical Medicine* (9ª ed. Londres: Blackwell Scientific, 1993).

*Esquema da biossíntese das substâncias solúveis*

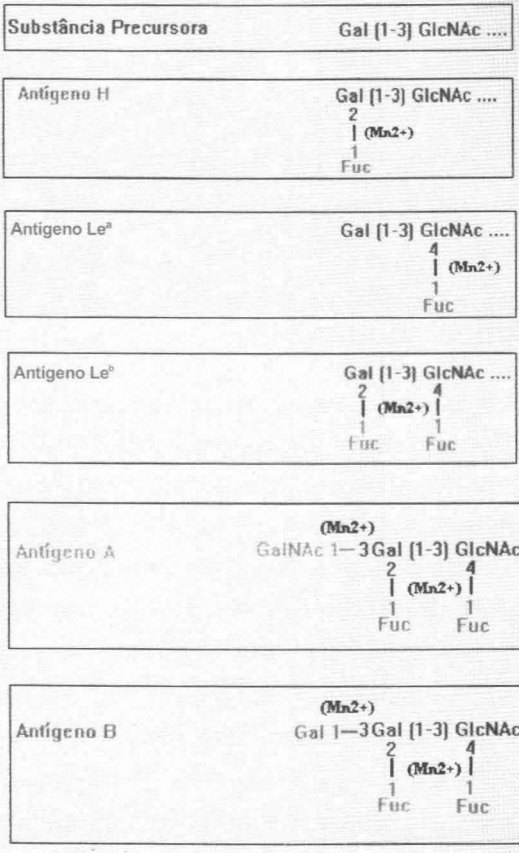



FIGURA 3. ESQUEMA DA BIOSSÍNTESE DOS ANTÍGENOS ABO, H E LEWIS EM CÉLULAS DE MUCOSA SALIVAR.

Vejamos, a seguir, detalhadamente, como ocorre a biossíntese das substâncias solúveis:

- As células da mucosa salivar produzem substâncias precursoras dos tipos 1 e 2, e as do tipo 1 apresentam ligação do tipo 1-3 entre a Gal β e a GlcNac e, por isso, apresentam ligação livre no carbono 4 da GlcNac.
- O gene *Lewis (FUT3)* produz uma enzima do tipo 4-alfa-fucosiltransferase. Esta ligará uma fucose no carbono 4 livre, produzindo o antígeno Lewis a ($Le^a$).

- Pela atividade da enzima produzida pelo gene secretor (FUT2), 2-alfa-fucosiltransferase, outra fucose é ligada ao carbono 2 da Gal β, produzindo o antígeno H.
- A especificidade conhecida como antígeno Lewis b ($Le^b$) é, na verdade, a interação dessas duas especificidades ($Le^a$+H), nos indivíduos LeSe.
- As enzimas A e B produzirão, então, os fenótipos ABO da mesma maneira que nos eritroblastos.

## Genética molecular

- Vários genes interagem na formação dos antígenos do sistema ABO. Como já dissemos, os genes ABO *(ABO)*, H *(FUT1)*, Lewis *(FUT3)* e secretor *(FUT2)* formam glicosiltransferases que adicionam açúcares à mesma substância precursora da hemácia.
- Lembrando: os genes *ABO* estão no cromossomo autossômico 9. Os genes *FUT1*, *FUT2* e *FUT3* estão no cromossomo autossômico 19.
- Os genes *ABO* possuem sete éxons, em DNA de 18 kb.
- Os polimorfismos do sistema ABO são causados por mutações na seqüência de nucleotídeos no DNA. O gene $A^1$ é considerado o gene selvagem.
- Gene *B*: mutações de ponto missense e silenciosas provocaram o aparecimento de gene *B*. Este difere do gene *A* em sete nucleotídeos no DNA, sendo quatro mutações missense (com troca de 4 aminoácidos na proteína resultante) e três silenciosas (sem troca de aminoácidos na proteína). Essas mutações estão localizadas nos *éxons* 6 (uma mutação) e 7 (seis mutações).
- Gene *O*: originou-se de uma única mutação nonsense no *éxon* 6 (sem sentido, que gera um *stop códon*, a partir do qual a proteína não é mais formada), o que provocou a síntese de uma transferase afuncional, que não transporta açúcares à substância precursora. Essa mutação é uma deleção de um nucleotídeo no DNA (guanina), na posição 261. O restante da seqüência é idêntica ao gene *A*. (Figura 4)

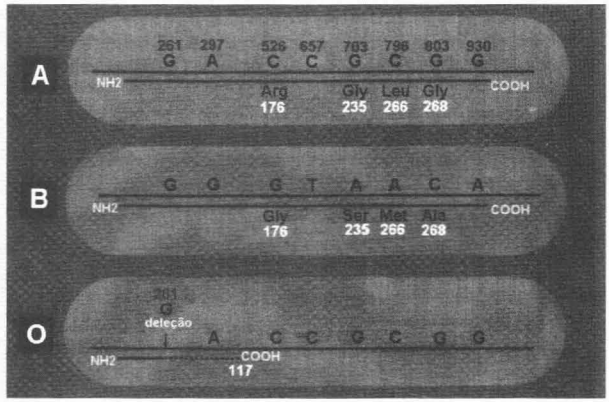



FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES *ABO* (LINHA SUPERIOR) E AS PROTEÍNAS (TRANSFERASES) CODIFICADAS POR ELES (LINHA INFERIOR).

## Subgrupos ABO

Podemos encontrar na fenotipagem direta ABO diferentes expressões (variações quantitativas) dos antígenos A ou B. Ou, mesmo, encontrar algumas discrepâncias entre a prova direta e reversa, por exemplo: indivíduos com prova direta indicando grupo A, mas apresentando em seu soro e/ou plasma anticorpos que aglutinam a hemácia-teste A, além da hemácia-teste B.

### COMO EXPLICAR ESSES ACHADOS?

#### *Subgrupos ABO*

- Recentemente foi demonstrado que os subgrupos de A e B resultam de alterações genéticas, mutações da estrutura do gene produtor da glicosiltransferase.
- Subgrupos de A: os fenótipos apresentam diferenças quantitativas e qualitativas, embora sejam formados do mesmo açúcar.
- O gene $A^1$ difere do gene $A^2$ por uma deleção de base na região C-terminal, além de uma mutação de ponto missense na posição 467 (C→T), provocando uma substituição de aminoácidos (prolina por leucina) na glicosiltransferase resultante. (Figura 5)

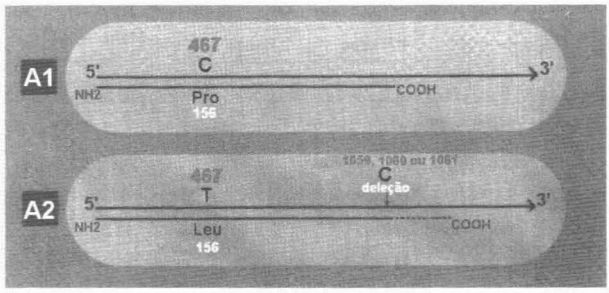



FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES $A^1$ E $A^2$ (LINHA SUPERIOR) E AS PROTEÍNAS (TRANSFERASES) CODIFICADAS POR ELES (LINHA INFERIOR).

- Em função da melhor eficácia da enzima $A_1$ no transporte do açúcar A para seu substrato, o número de sítios para $A_1$ está em torno de 1 milhão por hemácia, enquanto $A_2$ 300 mil por hemácia. Isso explica as diferenças quantitativas entre os dois antígenos.
- Bioquimicamente, a transferase $A_2$ não consegue ligar carboidratos nas cadeias H ramificadas e sim nas lineares, conduzindo às diferenças qualitativas entre os dois fenótipos. Esse fato também é demonstrado pela ocorrência em aproximadamente 4% dos indivíduos $A_2$ de anticorpos naturais anti-$A_1$. Cerca de 25% dos indivíduos $A_2B$ produzem anti-$A_1$ natural.
- Por isso, utilizamos a lectina anti-$A_1$ (*Dolichos biflorus*) para definição de subgrupos A. Essa lectina reage especificamente com hemácias $A_1$.
- Nos subgrupos mais raros, a quantidade de antígeno A decresce, continuamente, de $A_1$ até $A_m$. A reação antígeno-anticorpo somente é visível (hemaglutinação) quando o número de sítios antigênicos é superior a 2 mil. Portanto, em alguns subgrupos, nos quais os açúcares estão muito fracamente expressos, poderemos observar até mesmo reações negativas na prova direta, discrepantes dos resultados obtidos na prova reversa. Ex.: subgrupos $A_m$, $A_y$.
- No subgrupo $A_3$, temos hemácias com mais e com menos de 2 mil sítios antigênicos, levando à ocorrência de "campo misto" ou "dupla população". (Figuras 6 e 7)
- A identificação desses fenótipos pode ser feita, portanto, por meio da fenotipagem com lectinas anti-$A_1$ e anti-H (*Ulex europaeus*), teste de fixação-eluição e pesquisa de antígenos na saliva (de indivíduos secretores).

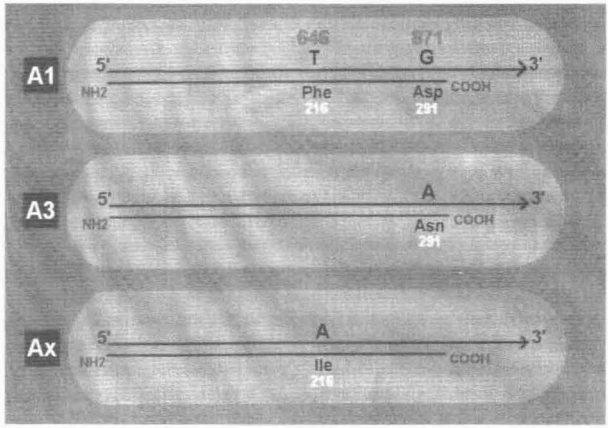



FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES *A1*, *A3* E *Ax* (LINHA SUPERIOR) E AS PROTEÍNAS (TRANSFERASES) CODIFICADAS POR ELES (LINHA INFERIOR).

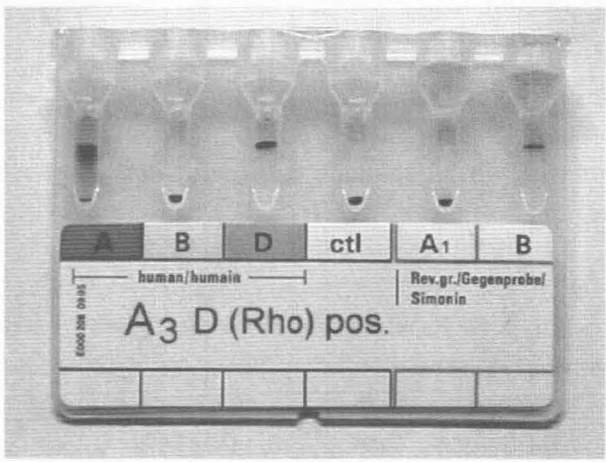



FIGURA 7. DETERMINAÇÃO DE SUBGRUPO $A_3$ PELO MÉTODO DE GEL-TESTE CENTRIFUGAÇÃO (DIAMED AG, SUÍÇA).

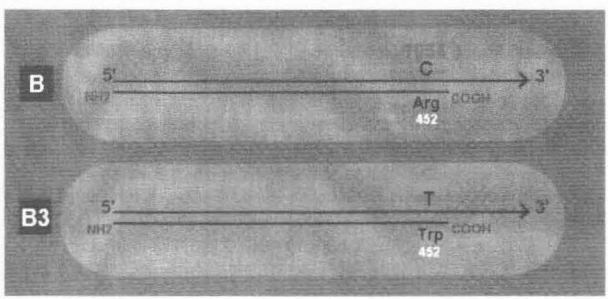



FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES *B* E *B3* (LINHA SUPERIOR) E AS PROTEÍNAS (TRANSFERASES) CODIFICADAS POR ELES (LINHA INFERIOR).

TABELA PARA IDENTIFICAÇÃO DE SUBGRUPOS ABO

| | Reações das hemácias com anti-soros | | | | Reações dos soros e/ou plasma com hemácias-teste | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fenótipos | Soro anti-A | Soro anti-B | Soro anti-AB | Lectina anti-H | Lectina anti-$A_1$ | Hem $A_1$ | Hem $A_2$ | Hem B | Hem O | Saliva do secretor |
| $A_1$ | 4+ | 0 | 4+ | 0 | 4+ | 0 | 0 | 4+ | 0 | A e H |
| $A_{int}$ | 4+ | 0 | 4+ | 3+ | 2+ | 0 | 0 | 4+ | 0 | A e H |
| $A_2$ | 4+ | 0 | 4+ | 2+ | 0 | ** | 0 | 4+ | 0 | A e H |
| $A_3$ | 2+CM | 0 | 2+CM | 3+ | 0 | ** | 0 | 4+ | 0 | A e H |
| $A_m$ | 0/+- | 0 | 0/+- | 4+ | 0 | 0 | 0 | 4+ | 0 | A e H |
| $A_x$ | 0/+- | 0 | +/2+ | 4+ | 0 | 2+/0 | 0/+ | 4+ | 0 | H |
| $A_{el}$ | 0 | 0 | 0 | 4+ | 0 | 2+/0 | 0 | 4+ | 0 | H |
| B | 0 | 4+ | 4+ | 0 | - | 4+ | 4+ | 0 | 0 | B e H |
| $B_3$ | 0 | +/ CM | 2+/CM | 4+ | - | 4+ | 4+ | 0 | 0 | B e H |
| $B_m$ | 0 | 0 | 0/+- | 4+ | - | 4+ | 4+ | 0 | 0 | B e H |
| $B_x$ | 0 | 0/+- | 0/2+ | 4+ | - | 4+ | 4+ | 0 | 0 | H |

Fonte: American Association of Blood Banks, *Technical Manual*, cit.

*** A ocorrência de anti-A1 nestes fenótipos é variável.*

*+- = Intensidade fraca de aglutinação.*

*CM = campo misto*

Obs.: para interpretação das intensidades de aglutinação, consultar tabela da pág. 78.

- Existem subgrupos de B, porém são muito raros, e têm mecanismos genéticos, moleculares e sorológicos semelhantes aos subgrupos de A. (Figura 8)
- Lembrando: reatividade de anti-H varia com diferentes grupos sangüíneos: O > A2 > B > A2B >A1 >A1B.

O açúcar imunodominante nos subgrupos é idêntico aos originais. Transfusionalmente não é importante distinguir-se os subgrupos, mas detectá-los.

## Anticorpos ABO

Relembrando: anticorpos ABO estão presentes nos soros e/ou plasmas de indivíduos, contra os antígenos que eles não possuem nas hemácias.

Mas como se dá o aparecimento desses anticorpos?

Foi comprovado que esses anticorpos se formam naturalmente contra antígenos que não estão presentes nas hemácias. Os estímulos são passivos, principalmente das bactérias que começam a colonizar o trato intestinal a partir do nascimento, pois possuem açúcares em suas membranas celulares semelhantes aos açúcares imunodominantes dos antígenos A e B. Essas bactérias, assim como outros estímulos externos, como poeira, alimentos etc., vão estimular a formação dos anticorpos anti-A e/ou anti-B, que passam a ser classificados, portanto, como naturais e regulares (ocorrência regular e estímulo natural). Geralmente são misturas de IgM e IgG.

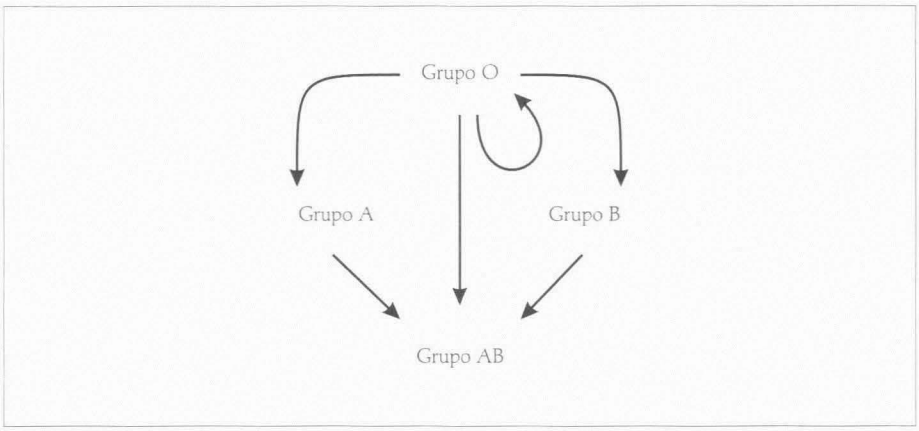
- Anticorpos anti-A e/ou -B imunes, geralmente IgG, podem ocorrer principalmente por heteroimunização (infecções bacterianas intestinais, soros antidiftéricos ou tetânicos de origem animal/bacteriano) e aloimunização por gestação ou transfusão ABO incompatível.
- Entre 3 e 6 meses de idade já é possível encontrar pequenas quantidades de anticorpos, mas sua produção máxima se dá entre 5 e 10 anos. Após 65 anos o título desses anticorpos diminui, a ponto de se tornar difícil sua identificação por meio da prova reversa. *Portanto, não é recomendada a realização da prova reversa nas fenotipagens ABO de recém-nascidos.*

- Os anticorpos naturais ABO reagem melhor a 4 °C, podendo também ter atividade a 37 °C. Os anticorpos anti-$A_1$ são de baixa amplitude térmica (pouco ou não ativos a 37 °C), não tendo importância clínica.
- Tanto anticorpos ABO classe IgM como IgG são capazes de ativar complemento, provocando hemólise intravascular em caso de transfusões incompatíveis. Podem ser fatais.
- Doença hemolítica do recém-nascido por incompatibilidade ABO: ocorre entre mães O e filho A e/ou B, muito embora esses casos sejam menos graves que incompatibilidade por Rh (geralmente os sintomas e a evolução são menos acentuados).
- Os anticorpos anti-A e anti-B dos indivíduos B e A, respectivamente, são em sua maioria de classe IgM e pequena quantidade, IgG. Os anticorpos anti-AB de indivíduos de grupo O são de classe IgG e podem estar presentes em altos títulos. Recém-nascidos, filhos de mães O, têm, portanto, maior chance de desenvolver DHRN por incompatibilidade ABO.
- Anticorpos anti-H e anti-HI geralmente não possuem grande amplitude térmica, por isso sem importância clínica, exceto anti-H de indivíduos *Bombay*, conforme já citamos. Anti-H natural geralmente ocorre em indivíduos $A_1$ e $A_1B$ não-secretores. Anti-HI em indivíduos $A_1$ e $A_1B$ secretores.

Devemos prestar atenção ao conceito de doador-receptor universal, pois devemos lembrar que um indivíduo de grupo O apresenta em seu soro/plasma anticorpos anti-A, anti-B e anti-AB. Se doar sangue para outro indivíduo não-isogrupo, ainda que seja concentrado de hemácias, uma certa quantidade de plasma sempre estará presente. Se o título das aglutininas for elevado (superior a 1/100 no chamado doador O perigoso), poderá ocorrer reação transfusional.

Portanto, transfusionalmente, recomenda-se:

1. Doador e receptor com mesmo grupo ABO (isogrupo) sempre que possível.
2. Excepcionalmente, respeitar a regra transfusional:




## ABO e associações com doenças

Estudos sugerem que o sistema ABO está envolvido com *mecanismo positivo de seleção* em humanos e primatas. Isso confere certas vantagens e/ou desvantagens evolutivas. Algumas doenças parecem estar relacionadas com os grupos sangüíneos ABO: úlcera e gastrite duodenal, infecções, malignidade de tumores, tendências hemorrágicas e trombóticas, entre outras.

### Úlcera e gastrite duodenal

Parecem afetar mais os indivíduos de grupo O, na proporção de 1,35 para cada indivíduo do grupo A. Parecem estar relacionadas com a maior patogenicidade da *Helicobacter pylori* à mucosa dos indivíduos O. Envolvem mecanismos auto-imunes de respostas, levando à gastrite e lesão celular. Estudos mostraram que o antígeno $Le^b$ é o provável receptor para a bactéria no tecido gástrico. Isso explica por que somente uma parte dos indivíduos identificados como portadores da bactéria efetivamente desenvolve a doença.[3]

---

[3] ABO Blood Group System, http://www.bh.rmit.edu.au/mls/subjects/abo/resources/directory.htm; P. D. Issit & D. J. Anstee, *Applied Blood Group Serology* (4ª ed. Durham: Montgomery Scientific, 1999); A. P. Moran, "Pathogenesis of *Helicobacter Pylori*", em *Current Opinion in Gastroenterology*, nº 14, Supplement 1, 1998; M. Rios & C. Bianco, "The Role of Blood Groups Antigens in Infectious Diseases", em *Seminars in Hematology*, 37 (2), abril de 2000.

## Infecções

Algumas pandemias históricas estiveram relacionadas com a distribuição dos genes *ABO* nas populações de diversas partes do mundo, como peste bubônica e infecções por *Pox vírus*. A peste bubônica é causada pela bactéria *Yersinia pestis*. Essas bactérias parecem expressar um antígeno H-*like* em sua membrana celular. Como indivíduos O não formam anti-H, estes seriam mais suscetíveis à infecção e morte que indivíduos A, B e AB.[4]

Indivíduos do grupo O infectados por *Vibrio cholera* desenvolvem quadro de diarréia mais severa, podendo levar ao óbito. Estudos com a população de Bangladesh sugerem que esta pressão seletiva conferiu desvantagens à população do grupo O, e vantagens à população do tipo B, hoje mais prevalente nesta região.[5]

## Fungos

A incapacidade genética de secretar substâncias ABO (indivíduos *sese*) foi associada com o aumento da susceptibilidade à infecção superficial por *Candida albicans*, em indivíduos adultos. Essa associação também está clara em pacientes com diabetes não dependentes de insulina.[6]

Indivíduos do grupo B e AB secretores parecem ser mais susceptíveis à infecção por *E. coli* no trato urinário. As bactérias parecem ligar-se primeiramente ao carboidrato receptor de células epiteliais, antes da colonização das mucosas e infecção.[7]

## Malignidade de tumores

Muitos trabalhos relatam a alta incidência de diversos tipos de câncer em pacientes de grupo sangüíneo A. Células tumorais freqüentemente expressam neo-antígenos como antígeno A-*like*. O sistema imune do indivíduo A não reconhece o A-*like* como *não-próprio* e, portanto, não combate

---

4 ABO Blood Group System, cit.

5 R. I. Glass *et al.*, "Predisposition for Cholera of Individuals with O Blood Group: Possible Evolutionary Significance", em *Am. J. Epidemiol.*, 121 (6), 1985.

6 M. Rios & C. Bianco, *op. cit.*

7 *Ibidem.*

precocemente as células tumorais, permitindo o crescimento de tumores e favorecendo metástases. Como indivíduos dos grupos O e B possuem naturalmente anticorpos anti-A, estariam mais aptos a destruir essas células tumorais. O grau de malignidade parece também estar correlacionado à quantidade dos "antígenos-*like*" de grupos sangüíneos.[8]

## Desordens de coagulação

Indivíduos do grupo O tendem a ter menor nível plasmático de fatores V, VIII, IX e de VW que outros grupos e, portanto, estariam mais sujeitos a fenômenos hemorrágicos. Estudos mostraram alta incidência de úlceras gastrintestinais hemorrágicas neste grupo. Em contrapartida, indivíduos do grupo A apresentaram alta incidência de tromboses, em estudo de *risco estimado de trombose coronariana como causa de morte de mulheres*. No grupo de mulheres do tipo O, o risco foi calculado em 211 em 1 milhão; no grupo do tipo A, 680 em 1 milhão. Isso provavelmente se deve ao fato de os indivíduos de grupo A apresentarem altos níveis de fatores V, VIII, IX e VW.[9]

***Alguns assuntos indicados para melhor compreensão do texto:***

- genética básica e molecular
- nomenclatura ISBT para antígenos eritrocitários
- exercícios de herança genética dos grupos sangüíneos
- bioquímica básica: carboidratos, lipídios e proteínas
- sistema de grupo sangüíneo Lewis
- doença hemolítica perinatal

---

8 ABO Blood Group System, cit.; P. D. Issit & D. J. Anstee, *op. cit.*; M. Rios & C. Bianco, *op. cit.*

9 ABO Blood Group System, cit.; M. Rios & C. Bianco, *op. cit.*

# Sistema Rh (ISBT 004)

## Histórico

Em 1939, Levine e Stetson descobrem que a causa da eritroblastose fetal em um recém-nascido era a atividade de anticorpos maternos contra antígenos das hemácias fetais. Posteriormente, Levine e Katzin descreveram esse anticorpo como o mesmo que Landsteiner e Wierner produziram por meio da imunização de coelhos com hemácias de macacos Rhesus. O antígeno gerador da resposta imunitária foi, então, chamado de fator Rh.

Os anticorpos específicos para os antígenos Rh estão normalmente envolvidos em reações transfusionais graves e em casos de doença hemolítica perinatal (DHPN), tornando esse sistema, do ponto de vista da prática transfusional, o segundo mais importante, após o sistema ABO.

Até o presente momento, 45 antígenos foram relatados como pertencentes a esse sistema, e cinco destes (D, E, e, C, c) são os responsáveis por 99% dos problemas clínicos associados ao sistema Rh.

## Importância clínica

A importância clínica deve-se ao fato de o antígeno D ser altamente imunogênico. Estima-se que, se uma quantidade de 1 ml a 10 ml de glóbulos

vermelhos D positivos forem administrados a indivíduo D negativo, a chance de esse indivíduo desenvolver anti-D está estimada em 80% .[1]

Além disso, gravidez subseqüente com criança (feto) D positivo induz à imunização secundária da mãe, na qual o anticorpo IgG atravessará a barreira placentária, produzindo quadro de icterícia neonatal ou DHPN. Com o advento da imunoglobulina anti-D (ex.: RhoGam), observou-se importante redução dos casos de DHPN por incompatibilidade Rh, mas o anti-D ainda é o aloanticorpo mais comumente encontrado em recém-nascidos.

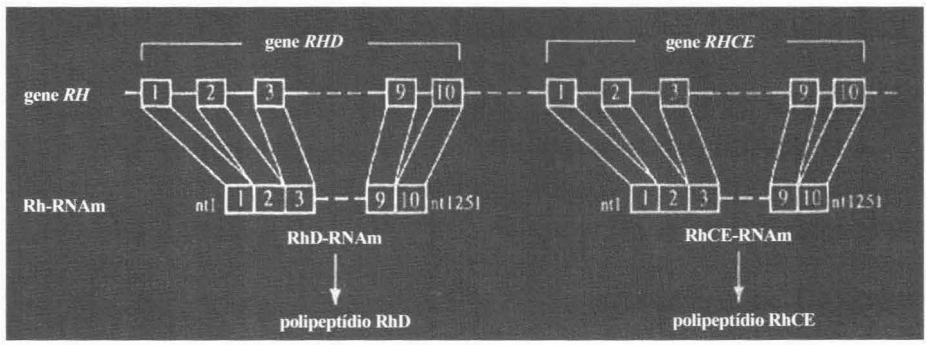
## Bioquímica e genética

Os antígenos Rh são exclusivamente eritrocitários, não sendo encontrados em leucócitos ou plaquetas, e surgem precocemente já em torno da 10ª semana de vida intra-uterina.

Apesar de o sistema contar com mais de 45 antígenos conhecidos, os mais importantes transfusionalmente são os antígenos D, C, c, E, e, responsáveis por quase 99% dos problemas clínicos associados ao sistema. A genética molecular mostrou que apenas dois genes estruturais, no cromossomo 1p34-p36, controlam a produção das proteínas não-glicosadas Rh:

- gene *RHD*, que não possui alelos, codifica a produção da proteína RhD que carreia o antígeno D;
- gene *RHCE*, que possui vários alelos (*RHCe, RHcE, RHce, RHCE*), codifica a produção da proteína RhCE (ce).

SÍNTESE DOS POLIPEPTÍDEOS Rh




Fonte: *Japanese Journal of Legal Medicine*, nº 52, 1998, pp. 1-18.

[1] L. Melo & J. A. Santos, "Sistema Rh", em *STD*, vol. 5, Belo Horizonte, 1996.

Estas lipoproteínas do sistema Rh são partes integrantes da membrana eritrocitária, atravessando-a 12 vezes (os segmentos amino-terminal e carboxil-terminal encontram-se intracelularmente). (Figuras 1 e 2)

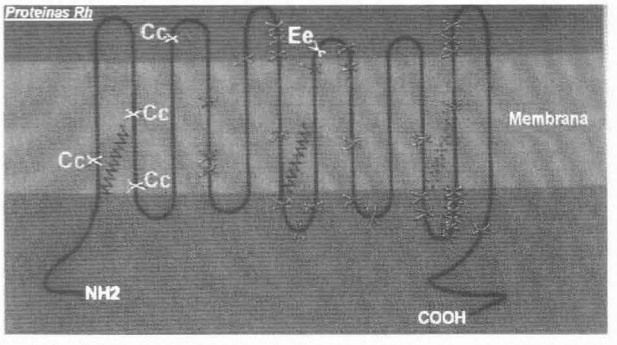



FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA RHCE.

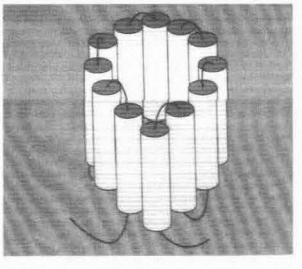


FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA RHD.

Temos, portanto, que o indivíduo considerado Rh positivo (D positivo) possui os dois genes Rh (*RHD* e *RHCE*), enquanto em indivíduos Rh negativos (D negativos), quase em sua totalidade (ver item "Pseudogene"), o *RHD* está deletado. Portanto, a notação "d", geralmente utilizada para representar o genótipo negativo, significa ausência do gene *RHD*, e não recessividade do gene. Aproximadamente 85% da população em geral é de indivíduos Rh positivos.

Os genes são co-dominantes, de forma que, quando os genes Rh herdados do pai são idênticos aos da mãe, chamamos o indivíduo de homozigoto. Se os genes herdados de pai e mãe forem diferentes, o indivíduo será considerado *heterozigoto*.

### *Pseudogene (Dψ)*

Normalmente, indivíduos Rh negativos caucasóides seguem a regra do gene *RHD* deletado. Mas estudos recentes demonstraram que, em algumas populações africanas, podemos encontrar até 2/3 dos indivíduos Rh negativos com o gene *RHD* presente. Analisando-se molecularmente, esse gene apresenta-se mutado (inserção de 37 pares de bases, gerando um *stop codon*, ou seja, proteína que não será traduzida a partir desta seqüência). Portanto, fenotipicamente esses indivíduos são identificados como Rh negativos, mas genotipicamente possuem o gene *RHD*. Denominou-se, então, esse novo gene de *pseudogene (Dψ)*.

A expressão dos antígenos Rh está relacionada à glicoproteína Rh50, produzida a partir da expressão do gene *RH50*, homólogo a *RHD* e *RHCE*, localizado no cromossomo 6p11-21. Na ausência dessa proteína, os antígenos Rh não se expressam ou expressam-se fracamente, dando origem aos fenótipos $Rh_{null}$ e $Rh_{mod}$. Além das proteínas RhD, RhCE e Rh50 (ou RhAG), outras proteínas associadas, como GPB, LW, CD47, formam o chamado complexo Rh na membrana eritrocitária. (Figura 3)

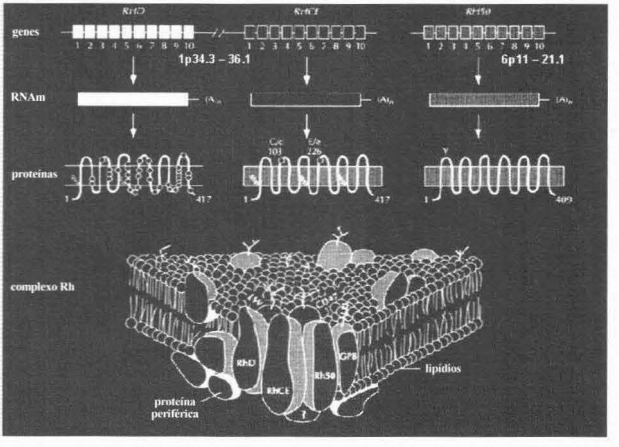



FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES, RNA MENSAGEIROS, PROTEÍNAS RELACIONADAS AO SISTEMA Rh, E O COMPLEXO FORMADO POR ELAS NA MEMBRANA ERITROCITÁRIA.

## Diferenças estruturais (polimorfismos) entre os antígenos D, C, c, E, e

Os genes *RHD* e *RHCE* apresentam uma estrutura similar. Se compararmos os polipeptídeos produzidos por ambos, constataremos homologia entre eles:

Tabela 1. Diferenças estruturais entre antígenos D, C, c, E, e

| | Proteínas Rh | | |
|---|---|---|---|
| Fenótipo Rh | Proteínas presentes | Peso molecular | Nº de aminoácidos |
| D positivo | Proteína D<br>Proteína CcEe | 32 KDa<br>34 KDa | 417<br>417 |
| D negativo | Proteína CcEe | 34 KDa | 417 |

Fonte: L. Melo & J. A. Santos, "Sistema Rh", em *STD*, vol. 5, Belo Horizonte, 1996.

A proteína C difere da proteína c, em quatro aminoácidos. Esse polimorfismo da proteína RhCE, produzido por mutações em seis nucleotídeos no gene *RHCE* (*ce*), apresenta um ponto importante de troca de aminoácidos na posição 103 da proteína (Ser103Pro).

A proteína E difere da proteína e em apenas um aminoácido, mas em posição importante na proteína (Pro226Ala). Polimorfismo produzido por mutação *missense* em apenas um nucleotídeo do gene.

A proteína D (presente em indivíduos Rh positivos) difere da proteína CcEe em 35 aminoácidos. Devido a essa grande diferença, o antígeno D é tão imunogênico para os indivíduos que não o possuem, ou seja, o indivíduo Rh negativo, quando recebe hemácias D positivas, é exposto a uma proteína que difere da sua em 35 aminoácidos (pelo menos dez em posições importantes da proteína).

Considerações: Por meio da utilização de anticorpos monoclonais, já se distinguiram diferentes epítopos dos antígenos E e e, e indivíduos com mutações genéticas que levam a antígenos variantes, como o modelo proposto para as variantes dos antígenos D.

### Antígeno $C^w$

O antígeno $C^w$ é produzido por um gene variante de *RHCE* (alelos *RHC$^w$e* ou *RHC$^w$E*). Não se trata de um antígeno C fraco, mas de um novo antígeno que pode estar presente independentemente dos fenótipos C/c. É antígeno de baixa freqüência, estimada em menos de 2% em brancos. (Figura 4)

Tabela 2. Diferenças estruturais entre os antígenos C, c e $C^w$

| Antígenos | Posição na proteína | Aminoácidos |
|---|---|---|
| C/c | 41 | Glicina |
| $C^w$ | 41 | Arginina |

Fonte: L. Melo & J. A. Santos, *op. cit.*

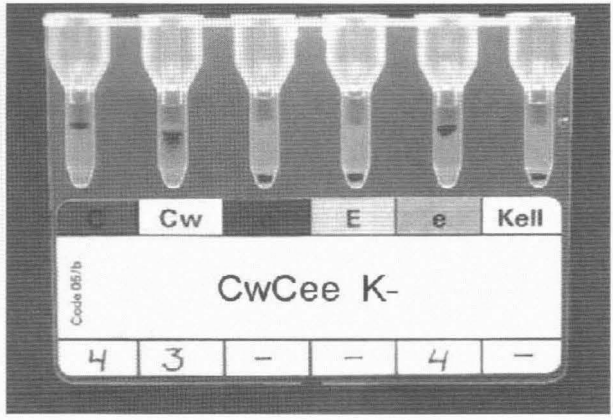



Figura 4. Fenotipagem para antígenos do sistema Rh (C, c, E, e, cw) e K (K1), pelo método de gel-teste centrifugação (DiaMed AG, Suíça).

## Teorias genéticas e moleculares e nomenclaturas

Várias nomenclaturas foram anteriormente desenvolvidas: Fischer-Race (CDE), Wiener (Rh-hr), Rosenfield (numérico), sendo as duas primeiras baseadas em modelos genéticos postulados para explicar a origem dos antígenos desse sistema.

O modelo genético de Fischer e Race (CDE) propõe que a produção dos antígenos é controlada por três pares de genes alelos (sendo os genes *D, d, C, c, E, e*), cujos *loci* estão estreitamente ligados, formando complexo gené-

tico que é transmitido em bloco durante a meiose (haplótipo). Cada haplótipo forma, sobre a membrana da hemácia, uma combinação específica de três antígenos, e cada indivíduo herda dois haplótipos (um paterno, outro materno). Se os dois haplótipos são idênticos, o indivíduo é *homozigoto*; se são diferentes, *heterozigoto*. Na atualidade, sabe-se que essa teoria genética não é verdadeira, porém sua nomenclatura para os antígenos Rh permaneceu, sendo muito utilizada em bancos de sangue.

Já Wiener, com base em seu modelo genético, estabeleceu a nomenclatura Rh-Hr, que é de mais difícil compreensão. Pela sua teoria, existe apenas um par de genes alelos no *locus* Rh que produz um só antígeno (aglutinógeno) com múltiplas especificidades, chamadas de fatores do sistema Rh. Cada gene e cada aglutinógeno com suas especificidades (fatores) são representados conforme tabela a seguir:

| Gene | Aglutinógeno | Especificidades (fatores) |
|---|---|---|
| $R^0$ | $R_0$ | $Rh_0$, hr', hr'' |
| $R^1$ | $R_1$ | $Rh_0$, rh', hr'' |
| $R^2$ | $R_2$ | $Rh_0$, hr', rh'' |
| $R^z$ | $R_z$ | $Rh_0$, rh', rh'' |
| r | r | hr', hr'' |
| r' | r' | rh', hr'' |
| r'' | r'' | hr', rh'' |
| $r^v$ | $r_v$ | rh', rh'' |

Como sabemos, herdamos um par de genes alelos dos nossos progenitores e, assim, o fenótipo de cada indivíduo é representado, na terminologia Rh (Wiener), de acordo com a combinação dos genes herdados dos pais: $R^1R^1$, $R^1R^2$, $R^zr$, *rr* etc.

Atualmente, estudos comprovaram que ambas as teorias estão incorretas, mas permaneceram as nomenclaturas. Sabe-se que na realidade dois genes, *RHD* e *RHCE* (e alelos) são os responsáveis pela formação das proteínas RhD e RhCE (ce), conforme sugerido na teoria desenvolvida por Patrícia Tippett em 1986.

## Variantes fenotípicas do antígeno D

O antígeno D pode variar de expressão fenotípica, devido a alterações qualitativas/quantitativas, a saber:

- D normal: o antígeno D é um mosaico de subunidades (ou epítopos). O indivíduo D normal possui todos os epítopos, previstos inicialmente como nove. Estudos atuais demonstram que esse número é superior a 30 epítopos diferentes.
- D fraco: antigamente designado por Du, definia as hemácias que reagiam somente com o soro anti-D em fase de antiglobulina. Atualmente, a determinação sorológica do D fraco dependerá da qualidade do reagente e da técnica empregada. Trata-se de variação quantitativa produzida por variação *qualitativa* do antígeno D. A menor expressão da proteína RhD na membrana eritrocitária se deve a alterações qualitativas na sua porção intramembranar (não é reconhecida pelos anticorpos) (Figura 5, capítulo 4, p. 78). Indivíduos com esse fenótipo não produzem anti-D caso recebam transfusão de hemácias D normal. Estima-se que a freqüência de D fraco na população seja inferior a 1%, sendo mais comum em negros.
- D parciais: são caracterizados pela ausência de um ou mais epítopos do antígeno D, que foram substituídos por epítopos da proteína CcEe. Essas trocas foram promovidas por mutações de ponto *missense* ou rearranjos gênicos entre genes *RHD* e *RHCE*, alterando qualitativamente a proteína RhD na porção extracelular. Também denominados *D categoria*. Sorologicamente, nas práticas de rotina, são de difícil distinção, podendo ser detectados por anti-soros monoclonais; algumas categorias são identificadas como D fraco ou, como no caso do $D^{III}$, apresentam-se sorologicamente normal; em alguns casos (indivíduos previamente transfundidos ou gestações e/ou abortos prévios), podemos encontrar no soro anticorpo irregular anti-D. Algumas categorias já determinadas molecularmente: $D^{I, II, III, IV, V, VI, VII}$, DMH, DHR, DFR, DCS, entre outros. Veja a tabela a seguir demonstrando a diferença dos D categorias de acordo com os nove epítopos mais imunogênicos:

CATEGORIAS DE ANTÍGENOS D (OU D PARCIAIS)

| Categorias | Epítopos presentes | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | epD1 | epD2 | epD3 | epD4 | epD5 | epD6 | epD7 | epD8 | epD9 |
| II | + | + | + | - | + | + | + | + | - |
| III a | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| III c | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| IV a ($Go^a$) | - | - | - | + | + | + | + | + | - |
| IV b | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| V a ($D^w$) | - | + | + | + | - | + | + | + | + |
| VI | - | - | + | + | - | - | - | - | + |
| VII (Tar) | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| DFR | - | - | + | + | - | - | - | - | + |

Fonte: L. Melo & J. A. Santos, *op. cit.*

### *Considerações*

O limite para diferenciação entre antígenos D fraco e parcial, dependendo de sua categoria, é muito tênue, e existem autores que questionam se os indivíduos D fraco poderiam formar anti-D e se esses antígenos D fracos poderiam realmente imunizar indivíduos D normais.[2]

## SIGNIFICADO CLÍNICO

Os indivíduos que expressam o antígeno D fraco são fenotipicamente Rh positivos.

Transfusionalmente, a conduta ainda é controversa, mas geralmente:

- *Doadores D fraco*: devem ser considerados Rh positivos, pois podem sensibilizar receptor para anti-D, ou mesmo reagir com anti-D previamente formado.
- *Receptores D fraco*: a regra para se evitar imunizações transfusionais ou feto-maternas de indivíduos D parciais fracos (ex.: $D^{VI}$) é:

[2] P. Y. Pennec, *Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia*, nº 22, 2000, pp. 244-245.

transfundir sangue D negativo em indivíduo D fraco e fazer prevenção de imunização de mãe D fraco com imunoglobulinas anti-Rh (ex.: RhoGam).

## Anticorpos Rh

Clinicamente significativos, reagem otimamente a 37 °C e fase de antiglobulina humana. Quase todos resultam de aloimunização por transfusão ou gravidez, pertencendo geralmente à classe IgG.

O antígeno D é altamente imunogênico, e uma vez formado o anti-D, este persiste por muitos anos.

A maioria dos casos de DHPN é devida ao antígeno D.

Auto-anticorpos também poderão ser formados, geralmente de especificidade anti-e, seguido de anti-c, anti-E, anti-C, anti-D.

A reatividade dos anticorpos pode ser exacerbada em testes de pesquisa e identificação de anticorpos irregulares, quando utilizamos hemácias tratadas com enzimas proteolíticas, como papaína, ficina e bromelina.

# Outros sistemas de grupos sangüíneos de importância transfusional

7

## Introdução

Antígenos eritrocitários são estruturas membranares, herdados geneticamente e são definidos por seqüências de aminoácidos específicas (antígenos protéicos) ou por carboidratos ligados a essas proteínas ou lipídios.

Como já vimos anteriormente, antígenos protéicos são produtos diretos dos genes que os codificaram. Ex.: antígenos do sistema Rh.

Antígenos carboidratos são produtos secundários de genes produtores de glicosiltransferases, que transportam carboidratos para estruturas precursoras da membrana do glóbulo vermelho. Ex.: antígenos ABO.

As proteínas carreadoras de antígenos de grupos sangüíneos desempenham papéis importantes na morfologia (proteínas estruturais) e fisiologia do glóbulo vermelho, como recepção e transporte de substâncias através da membrana celular, entre outros. Além disso, já se conhecem características como susceptibilidade ou resistência a determinadas doenças, na presença e/ou ausência de certos antígenos de grupos sangüíneos. Ex.: antígenos Duffy e resistência à malária, como será explicado a seguir.

### *Relembrando alguns conceitos fundamentais*

- Antígeno: estrutura presente na membrana eritrocitária capaz de produzir um anticorpo específico, quando apresentado ao sistema imuno-

lógico de indivíduos que não apresentem o mesmo antígeno. O anticorpo produzido é capaz de se ligar ao antígeno e ser detectado por testes imunológicos.

- Fenótipo eritrocitário: descreve quais antígenos estão presentes na membrana eritrocitária estudada, a partir de anticorpos específicos (testes sorológicos).
- Genótipo: descreve o conjunto de genes presentes em um indivíduo.
- Lembre-se: o estudo sorológico dos eritrócitos permite unicamente a determinação do fenótipo e jamais do genótipo, que somente poderá ser determinado por investigação familiar ou análise do DNA.

## O que são os sistemas de grupos sangüíneos?

Incluem os antígenos produzidos a partir de genes alelos de mesmo *locus* gênico, ou por um complexo de dois ou mais genes homólogos intimamente ligados sem que ocorra recombinação entre eles.[1]

Genes alternativos em mesmo *locus* são denominados alelos. Os antígenos produzidos por alelos são antitéticos, um ao outro. Portanto, os termos homozigose e heterozigose aplicam-se a genes e não a antígenos.

Ex.: é incorreto dizer: *hemácia homozigota para antígeno* M (devido ao fenótipo M+N-). O correto é dizer: *hemácia de indivíduo homozigoto para o gene M.*

## Terminologia

Normalmente observamos o uso incorreto das terminologias utilizadas para indicar antígenos, anticorpos, genes e suas abreviações.

Na tabela a seguir, damos alguns exemplos das designações corretas e incorretas:

---

[1] P. D. Issit & D. J. Anstee, *Applied Blood Group Serology* (4ª ed. Durham: Montgomery Scientif, 1999).

Tabela 1. Terminologias corretas e incorretas

| Designação dos termos | Correta | Incorreta |
|---|---|---|
| Fenótipos ABO e Rh(D) | ABRh+; BRh- | AB+; B- (designa ausência do antígeno B); ABpositivo; Bnegativo |
| Fenótipos MNS | M+N- | MM (supõe genótipo); M(+) |
| Antígeno | K | Kell (nome do sistema) |
| Anticorpo | Anti-K | Anti K; Anti-Kell; kell (sem a designação para anticorpo) |
| Fenótipo sistema Kell | K-k+Kp(a-b+) | K-k+Kpa-Kpb+; Knegativo kpositivo; K(-)k(+) etc. |
| Fenótipo Lewis | Le(a+) | Lea+; $Le^a$+; Leapositivo; Lewis a +; Lea(+) |
| Antígenos | $Jk^a$; $Jk^b$ | JKa; JKb; $JK^a$; $JK^b$ |

Fonte: Adaptado de P. D. Issit & D. J. Anstee, *op. cit.*, p. 8.

## Nomenclatura ISBT

Na tentativa de padronização da nomenclatura, a Sociedade Internacional de Transfusão Sangüínea (ISBT) criou, em 1980, um grupo de trabalho (Working Party on Terminology of Red Cells Surface Antigens), que estudou uma forma numérica que pode ser expressa mais facilmente em meios eletrônicos, como computadores.

Tentaremos, simplificadamente, esclarecer alguns pontos principais desse trabalho.

Tabela 2. Nomenclatura dos antígenos eritrocitários

| Sistema | | Antígenos | Fenótipos |
|---|---|---|---|
| ABO | A $A^1$ $A^2$ B | A $A_1$ $A_2$ B | A $A_1$ $A_2$ B |
| Rh | D C E c e | D C E c e | D+ C+ E- c+ e+ |
| MNS | M N S s | M N S s | M+ N+ S- s+ |
| P | $P^1$ | $P_1$ | $P_1$+ $P_1$- |
| Lewis | Le le | $Le^a$ $Le^b$ | Le(a+) Le(a- b+) |
| Kell | K k $Kp^a$ $Js^a$ | K k $Kp^a$ $Js^a$ | K- k+ Kp(a+) Js(a-) |
| Kell | $K^1$ $K^2$ $K^3$ | K1 K2 K3 | K: -1, 2, -3 |
| Scianna | $Sc^1$ $Sc^2$ Sc | Sc1 Sc2 | Sc: -1, -2, -3 |
| Kidd | $Jk^a$ $Jk^b$ $Jk^3$ | $Jk^a$ $Jk^b$ Jk3 | Jk(a+) Jk(a+b+) Jk: 3 |

Fonte: M. G. Aravechia, "Nomenclatura ISBT". Curso de aperfeiçoamento em imuno-hematologia eritrocitária. Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo, 2000.

Atualmente existem 250 antígenos, agrupados em 25 sistemas de grupos sangüíneos, além de cinco coleções e dezesseis séries.[2]

- Sistema numérico que utiliza seis dígitos, sendo os três primeiros designados para o sistema , coleções ou séries, e os três últimos para a especificidade dos antígenos.

  Ex.: antígeno B (002) do sistema ABO (001). Portanto: 001002.

  - Coleções: especificidades que até o momento não foram relacionadas a qualquer sistema já estabelecido devido a dados insuficientes.
  - Séries: congregam antígenos de baixa (série 700) ou alta freqüência (série 900), que ainda não foram definidos ou excluídos dos sistemas já estabelecidos.
- A ordem numérica foi estabelecida levando-se em conta a ordem cronológica das identificações.

  No exemplo acima, os antígenos do sistema ABO foram os primeiros a ser descobertos. Portanto, sistema 001.
- Designação dos genes ou *loci* gênicos: escritos em letras maiúsculas e itálicas, ou na inexistência desse recurso, sublinhados. Ex.: ABO ou *ABO*.
- Os antígenos devem ser escritos em fonte regular. Os números ou letras adicionais deverão ser geralmente sobrescritas para genes e subscritas para antígenos. Ex.: antígeno $A_1$ produzido pelo gene $A^1$. Existem exceções como Colton: genes $Co^a$ e $Co^b$ e antígenos $Co^a$ e $Co^b$.
- Designação de *fenótipos*:
  - símbolo seguido por dois pontos;
  - números de cada especificidade, com separação por vírgulas;
  - sinal de menos precede o numeral, quando o antígeno não está expresso.

| Fenótipo Rh | | | ISBT |
|---|---|---|---|
| D+C+E-c+e+ | DCce | $R_1r$ | RH: 1, 2, -3, 4, 5 |
| D-C-E-c+e+ | ccee | rr | RH: -1, -2, -3, 4, 5 |

[2] Segundo dados da ISBT, 2000.

- Alelos ou haplótipos:
  - símbolo do sistema em itálico;
  - espaço ou asterisco;
  - números separados por vírgulas ou especificidades;
  - gene amorfo ou *null* representado por zero.

| | | |
|---|---|---|
| *CDe* | $R^1$ | *RH 1, 2, 5* |
| *cde* | *r* | *RH 4, 5* |

- Restam ainda definir:
  - a classificação de determinantes eritrocitários definidos por crioaglutininas;
  - a numeração dos diversos epítopos do antígeno RH1 (D), e outras especificidades antigênicas complexas, particularmente do sistema MNS.

## Outros sistemas de grupos sangüíneos de importância transfusional

Muita coisa poderia ser dita sobre os sistemas de grupos sangüíneos. Mas procuraremos aqui falar sobre os sistemas mais importantes na prática transfusional, e de suas características fundamentais, procurando nos ater somente aos antígenos e anticorpos de maior importância dentro de cada um.

### Sistema Kell (006)

- Símbolo do sistema: KEL
- Nome do gene: *KEL*
- Classificação ISBT: 006
- Número de antígenos associados: foram descritos até o momento 23 antígenos associados a esse sistema.[3]

[3] G. Daniels *et al.*, "ISBT Working Party Oslo Report", em *Vox Sanguinis*, 77 (1), 1999.

- Sistema associado: XK
- Símbolo: XK
- Classificação ISBT: 019 (antigo KEL15)
- Composto por um único antígeno Kx (XK1)
- Localização cromossômica:
  - O gene *KEL* está no cromossomo 7q33. Controla conjuntos de antígenos antitéticos, sendo os mais importantes K(K1)/k(K2), $Kp^a$ (K3)/$Kp^b$ (K4)/$Kp^c$(21) e $Js^a$(K6)/$Js^b$(K7).
  - O gene *XK* está no cromossomo Xp21.1-Xp21.2, e codifica proteína XK, com único antígeno Kx(XK1).

Histórico: primeiro a ser descoberto por meio do teste de antiglobulina humana, pela demonstração do anticorpo anti-K (K1), em caso de doença hemolítica perinatal (DHPN).

Bases moleculares: sistema polimórfico, onde existem variações importantes na expressão dos antígenos. Esses polimorfismos estão associados a mutações de ponto que levam à substituição de aminoácidos na proteína.

TABELA 3. BASES MOLECULARES DOS POLIMORFISMOS KELL

| Pos. a.a. | K1 (K) | K2 (k) | K3 ($Kp^a$) | K4 ($Kp^b$) | K21 ($Kp^c$) | K6 ($Js^a$) | K7 ($Js^b$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 193 | Metionina | Treonina | | | | | |
| 281 | | | Triptofano | Arginina | Glutamina | | |
| 597 | | | | | | Prolina | Leucina |

Os antígenos estão localizados em uma glicoproteína N-glicosilada (tipo II) de 93 kDa, produtos de um único gene, *KEL*, que contém 19 éxons, e que interage com a proteína XK. A ausência de *XK* resulta na síndrome McLeod e numa fraca expressão dos antígenos Kell. (Figura 1)

Funções fisiológicas: a glicoproteína Kell pertence à subfamília das endopeptidaes zinco-dependentes, cuja principal função é ativação de peptídeos bioativos por clivagem enzimática. A função de XK ainda não é conhecida, mas parece estar ligada a mecanismos de transporte na membra-

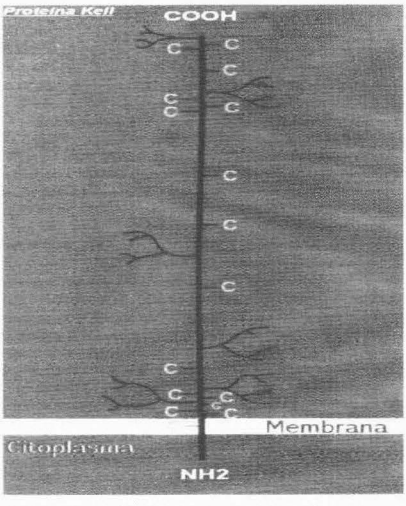



FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA KELL.

na. Semelhantes estruturalmente ao antígeno CALLA ou CD10 (leucemia linfóide aguda) presente em leucócitos.

Distribuição/freqüência dos antígenos: antígenos Kell estão presentes nos eritrócitos em baixa densidade (aproximadamente 3 mil sítios). Estão bem desenvolvidos ao nascimento e parecem estar presentes em alguns tecidos como cérebro, órgãos linfóides, coração e músculos esqueléticos.

TABELA: 4. FREQÜÊNCIA DOS FENÓTIPOS KELL

| | |
|---|---|
| K-k+Kp(a-b+)Js(a-b+) | 90% |
| K+k+Kp(a-b+)Js(a-b+) | 8% |
| K+k-Kp(a-b+)Js(a-b+) | 1% |
| K-k+Kp(a+b+)Js(a-b+) | 1% |
| Outros | raros |

Fonte: J. A. Santos. Curso de atualização em imuno-hematologia eritrocitária. Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo/DiaMed, 1998.

Imunogenicidade: antígeno K (K1) é três vezes *mais* imunogênico que c e E; vinte vezes *mais* imunogênico que os demais antígenos; mas seis vezes *menos* imunogênico que D.

A probabilidade de sensibilização após transfusão de uma unidade de sangue K+ é de aproximadamente 10%.[4]

Fenótipos raros: Ko/Kell null, provável gene silencioso no *locus KEL*; indivíduos não apresentam nenhum antígeno do sistema Kell nos eritrócitos.

Antígeno Ku: presente em todas as hemácias, exceto Ko.

TABELA 5. OUTROS ANTÍGENOS DO SISTEMA KELL

| | | |
|---|---|---|
| Ku | Ula | K11 |
| K12 | K13 | K14 |
| K16 | K17 | K18 |
| K19 | Km | K22 |
| K23 | K24 | VLAN |
| TOU | Kpc | |

Associação a doenças: síndrome McLeod, por deleção do gene *XK*. Herança ligada ao sexo, ocorrendo somente em homens. A síndrome inclui depressão dos antígenos Kell, acantocitose, anemia hemolítica, anormalidade do sistema neuromuscular, cardiomiopatia, com elevação nos níveis da enzima creatina fosfoquinase, pode estar associado à doença granulomatosa crônica.

Características sorológicas importantes: os antígenos do sistema Kell são inativados por tratamento com reagentes thiol, como DTT, 2-ME, AET e ZZAP.

### *Anticorpos do sistema Kell*

Significado clínico: clinicamente significativos, podendo ocasionar reações transfusionais e DHPN.

Ao contrário do anti-D, a concentração dos anticorpos não se relacionam com a severidade da DHPN, e portanto é importante a genotipagem do feto para se avaliar o risco gestacional.[5]

---

4 J. O. Bordin & G. J. Moreira, "Sistemas Kell e Kx", em *STD*, Belo Horizonte, 1996.

5 L. M. Castilho, "Aspectos da biologia molecular aplicados à imuno-hematologia". Curso de aperfeiçoamento em biologia molecular. Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo, 2001.

Caso seja identificado anticorpo contra antígenos do sistema KEL, deve-se fenotipar bolsa para o antígeno. Recomenda-se, também, que indivíduos em regime de transfusão crônica recebam unidades negativas para K (K1), para evitar sensibilização.

Comportamento sorológico: o anti-K, como os demais anticorpos do sistema Kell, é geralmente de classe IgG, reativo em fase AGH, e pode ser potente e ocasionar reações hemolíticas graves imediatas ou tardias, assim como DHPN grave.

O anti-K pode reagir salinicamente e não reagir bem em alguns meios de baixa força iônica (LISS); 20% dos anti-K ativam complemento. Tratamento do soro com enzimas proteolíticas não altera padrão de reatividade dos anticorpos.

Outros anticorpos:

- anti-k, -$Kp^b$, -$Js^b$ são raramente encontrados, pois os antígenos são de alta freqüência. Todos os casos de anti-Jsb foram relatados em negros;
- anti-$Kp^a$, -$Js^a$ também são raros, pois antígenos são de baixa freqüência. Estão comumente associados a outros anticorpos;
- anti-Ku: encontrado nos raros indivíduos de fenótipo $K_0$. Provocam reação hemolítica grave e DHPN;
- anti-Kx: encontrados em indivíduos com o fenótipo McLeod. Reage fortemente com hemácias $K_0$.

## Sistema Duffy (008)

- Símbolo do sistema: FY
- Nome do gene: *FY*
- Classificação ISBT: 008
- Número de antígenos associados: o sistema Duffy é composto por seis antígenos: $Fy^a$, $Fy^b$, Fy3, Fy4, Fy5 e Fy6.
- Localização cromossômica: o *locus* Duffy está no cromossomo 1q22-23.

Histórico: o primeiro caso de anti-$Fy^a$ foi descoberto em 1950 por Cutbush e colaboradores.

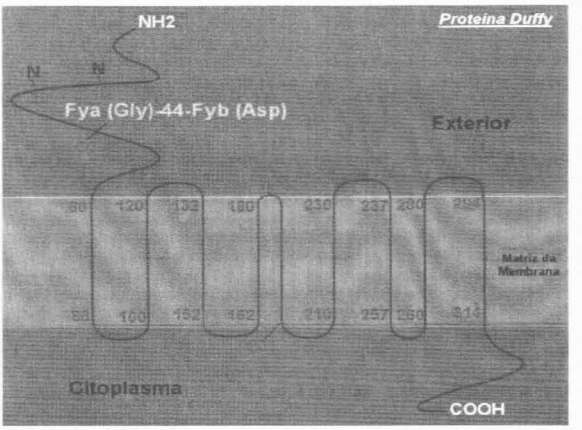



FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA DUFFY.

Bases moleculares: o gene *FY* possui dois éxons e um íntron, e codifica uma proteína multipasso, com 336/338 aminoácidos, que atravessa a membrana eritrocitária sete vezes (Figura 2). Os polimorfismos entre os antígenos $Fy^a$ e $Fy^b$ resultam de uma única substituição de aminoácido ($Gly^{44} \rightarrow Asp$). A freqüência fenotípica dos antígenos varia conforme a população estudada.

TABELA 6. BASES MOLECULARES DOS ANTÍGENOS DO SISTEMA DUFFY

| ISBT | Nomenclatura clássica | Freqüência relativa R. Branca | Freqüência relativa R. Negra | Bases moleculares do polimorfismo |
|---|---|---|---|---|
| FY1 | $Fy^a$ | Polimórfico | Polimórfico | Glicina - pos. 44 |
| FY2 | $Fy^b$ | Polimórfico | Polimórfico | Aspartato - pos. 44 |
| FY3 | $Fy^3$ | Alta | Polimórfico | - |
| FY4 | $Fy^4$ | Polimórfico | Alta | - |
| FY5 | $Fy^5$ | Alta | Polimórfico | - |
| FY6 | $Fy^6$ | Alta | Polimórfico | - |

Obs.: o polimorfismo $Fy^a/Fy^b$ resulta de uma simples substituição de nucleotídios no principal "éxon" do gene *FY*.

Fonte: J. A. Santos, curso de atualização em imuno-hematologia eritrocitária, cit.

Funções fisiológicas: a glicoproteína Duffy é quimiorreceptora nas hemácias para diversas substâncias, como quimiocinas (IL-8, Melanoma Growth Stimulating Activity (MGSA)) e receptora para o *Plasmodium vivax*

e *Plasmodium knowlesi*, sendo essencial para a invasão desses parasitas. Portanto, indivíduos Fy (a-b-), fenótipo comumemente encontrado em indivíduos negros africanos, são naturalmente resistentes à malária pelos plasmódios citados, o que certamente representa uma vantagem evolutiva.

Distribuição e/ou freqüência dos antígenos: os antígenos $Fy^a$ e $Fy^b$ são os mais importantes do sistema. Estão presentes em fetos de 6 a 7 semanas. Expressam-se em células eritróides e não-eritróides, como células endoteliais, epiteliais em vários órgãos como cérebro, rins, baço, coração, pulmão, pâncreas e placenta; não são detectados em linfócitos, monócitos e plaquetas.

Na população caucasiana três fenótipos correntes são definidos:

Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+).

Fenótipos raros: a presença simultânea das mutações 265C>T e 298G>A estão associadas ao surgimento de um fenótipo conhecido como $Fy^x$, em caucasianos.

O fenótipo Fy(a-b-) em caucasianos é produto de um gene alelo silencioso *FY*, em indivíduos dos genótipos $Fy^xFy$ e $Fy^xFy^x$.

Em africanos, o mesmo fenótipo Fy(a-b-) é produto de uma mutação de ponto na região promotora GATA-1(-33T>C) do gene Duffy, que leva a uma ausência de expressão do antígeno nas hemácias, mas não em outros tecidos. Isso explica por que indivíduos com esse fenótipo não desenvolvem anticorpos anti-Fy3. Esse fenótipo é muito raro entre caucasianos, mas comum na população negra, com freqüência girando em torno de 60% a 100%.

O antígeno Fy6 foi definido por um anticorpo monoclonal murino, de classe IgG1. É semelhante ao Fy3, mas com a diferença de ser sensível ao tratamento enzimático. As evidências sugerem que o Fy6 é necessário para a penetração do merozoíta *P. vivax* no eritrócito.

TABELA 7. FREQÜÊNCIAS FENOTÍPICAS DO SISTEMA DUFFY

**Fenótipos Duffy na raça branca**

| Raça branca | Anti-$Fy^a$ | Anti-$Fy^b$ | Anti-Fy3 | Anti-Fy5 | Freqüência |
|---|---|---|---|---|---|
| Fy (a+b-) | + | - | + | + | 19,5% |
| Fy (a-b+) | - | + | + | + | 33,0% |
| Fy (a+b+) | + | + | + | + | 47,5% |
| Fy (a-b-) | - | - | - | + | Raro |

| Fenótipos Duffy na raça negra | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Raça negra | Anti-$Fy^a$ | Anti-$Fy^b$ | Anti-Fy3 | Anti-Fy5 | Freqüência |
| Fy (a+b-) | + | - | + | + | 20,0% |
| Fy (a-b+) | - | + | + | + | 10,0% |
| Fy (a+b+) | + | + | + | + | 2,0% |
| Fy (a-b-) | - | - | - | - | 68,0% |

Obs.: hemácias de fenótipo $Rh_{null}$ apresentam reações negativas contra anti-Fy5, mesmo não sendo Fy(a-b-).

Fonte: J. A. Santos. Curso de atualização em imuno-hematologia eritrocitária, cit.

Imunogenicidade: os antígenos $Fy^a$ e $Fy^b$ são moderadamente imunogênicos. O antígeno $Fy^a$ é 40 vezes menos imunogênico que K (K1).

Associação a doenças: ainda não conhecida.

Características sorológicas importantes: enzimas proteolíticas como ficina, papaína e bromelina destroem os antígenos $Fy^a$, $Fy^b$ e $Fy^6$. A tripsina não destrói $Fy^a$ e $Fy^b$ e ainda intensifica a reatividade de $Fy^6$.

### *Anticorpos Duffy*

Significado clínico: são geralmente classe IgG e clinicamente significativos, podendo fixar complemento.

Comportamento sorológico: apresentam efeito de dose (reagem melhor quando testados com hemácias de indivíduos homozigotos para o gene em questão). Como alguns dos antígenos desse sistema ($Fy^a$, $Fy^b$ e $Fy^6$) geralmente são destruídos por ação de enzimas proteolíticas, os anticorpos não reagirão com hemácias de painel tratados enzimaticamente, podendo constituir um grande auxílio na identificação de anticorpos irregulares.

Freqüência:

- O anti-$Fy^a$ é relativamente comum. Pode causar DHPN moderada e reações transfusionais agudas e tardias. É raro em negros. Anti- $Fy^a$ é três vezes menos freqüente que anti-K(K1). Anti-$Fy^b$ é vinte vezes menos freqüente que anti-$Fy^a$.
- O anti-$Fy^b$ é incomum e geralmente associado a outros anticorpos.

Outros anticorpos:

- Anti-Fy3 pode ser formado em indivíduos brancos, com fenótipo Fy(a-b-), geralmente politransfundidos. É raro em negros. Age como se fosse uma mistura de anti-$Fy^a$ e anti-$Fy^b$, não sendo, porém, separado por procedimentos de adsorção e eluição. É resistente ao tratamento enzimático, reage com todas as hemácias que possuam $Fy^a$ e/ou $Fy^b$ e não reage com hemácias Fy(a-b-).
- O anti-Fy4 reage com células Fy(a-b-), com algumas Fy(a+b-) e Fy(a-b+) de negros, mas nunca com células Fy(a+b+).
- O anti-Fy5 é semelhante ao anti-Fy3, diferenciando-se deste pelo fato de apresentar reações negativas com células $Rh_{null}$ e com as células Fy(a-b-) de caucasianos.

## Sistema Kidd (009)

- Símbolo do sistema: JK
- Nome do gene: *JK* ou *SLC14A1*
- Classificação ISBT: 009
- Número de antígenos associados: o sistema Kidd é composto por três antígenos: $Jk^a$, $Jk^b$, $Jk^c$.
- Localização cromossômica: o *locus* Kidd está no cromossomo 18q12-q21.

Histórico: os antígenos deste sistema foram descritos entre os anos de 1951 e 1953.

Bases moleculares: o gene *JK* ou *SLC14A1* é composto por 11 éxons e 30 kb. Os éxons 4-11 codificam uma glicoproteína multipasso de 391 aminoácidos, que atravessa dez vezes a membrana do eritrócito. (Figura 3)

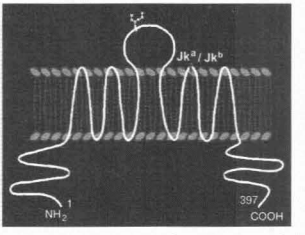



Figura 3. Representação esquemática da proteína Kidd.

TABELA 8. BASES MOLECULARES NO SISTEMA KIDD

| ISBT | Nomenclatura clássica | Freqüência relativa | Bases moleculares do polimorfismo |
|---|---|---|---|
| JK1 | $Jk^a$ | Polimórfico | Aspartato - pos. 280 |
| JK2 | $Jk^b$ | Polimórfico | Aspargina - pos. 280 |
| JK3 | Jk3 | Alta | - |

Fonte: J. A. Santos. Curso de atualização em imuno-hematologia eritrocitária, cit.

Funções fisiológicas: a proteína é integral e tem função de transporte de uréia, preservando a estabilidade osmótica e a deformabilidade do eritrócito.

Distribuição e freqüência dos antígenos: os antígenos $Jk^a$ e $Jk^b$ estão bem desenvolvidos ao nascimento (são detectados em torno da 7ª a 11ª semanas de gestação), e podem ser encontrados, além de eritrócitos, em células endoteliais de rim. Não foram detectados em outros tecidos, linfócitos, monócitos ou plaquetas. Existem três alelos, sendo dois deles co-dominantes, responsáveis pela produção dos antígenos $Jk^a$ e $Jk^b$, e outro aparentemente silencioso (*JK*), que leva à formação do fenótipo nulo Jk(a-b-). Os principais fenótipos Kidd são Jk(a+b-), Jk(a-b+) e Jk(a+b+).

TABELA 9. FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS DO SISTEMA KIDD

| Fenótipos | Reações com antisoros | | Genótipos | Freqüência em caucasianos |
|---|---|---|---|---|
| | Anti-$Jk^a$ | Anti-$Jk^b$ | | |
| Jk (a+b-) | + | - | $Jk^aJk^a$(Jk) | 28,0% |
| Jk (a-b+) | - | + | $Jk^bJk^b$(Jk) | 22,0% |
| Jk (a+b+) | + | + | $Jk^aJk^b$ | 50,0% |
| Jk (a-b-) | - | - | JkJk | Raro |

Fonte: J. A. Santos. Curso de atualização em imuno-hematologia eritrocitária, cit.

Imunogenicidade: apesar da moderada imunogenicidade dos antígenos, os anticorpos Kidd (anti-$Jk^a$ e anti-$Jk^b$) estão envolvidos em severas reações hemolíticas imediatas e tardias, em politransfundidos, e podem ocasionar DHPN não-severas.

Fenótipos raros: como já dissemos, Jk(a-b-) é raro, originado de gene silencioso *JK* em homozigose, ou de gene inibidor In(JK), não herdado no

mesmo *locus* Kidd e transmitido de maneira dominante. Apesar de esse fenótipo ser raro, é mais comumente encontrado em orientais, e ocasiona formação de anticorpo anti-Jk3, que reage com hemácias Jk(a+) e/ou Jk(b+).

Associação com doenças: indivíduos de fenótipos *null* Jk(a-b-) que não expressam a proteína nos eritrócitos apresentam resistência destes à lise em solução aquosa de uréia 2M e são incapazes de concentrar maximamente a urina.

Características sorológicas importantes: os antígenos $Jk^a$, $Jk^b$ e $Jk^c$ são resistentes ao tratamento enzimático (enzimas proteolíticas). Hemácias Jk(a-b-) são resistentes à lise celular por uréia 2M.

### *Anticorpos Kidd*

Significado clínico: os anticorpos Kidd são geralmente IgG (eventualmente misturas de IgG e IgM) e fixam complemento. Os antígenos Kidd são de difícil acesso aos anticorpos, pois a alça da proteína que não contém o polimorfismo é que se expressa melhor (mais longa).[6] Anticorpos anti-$Jk^a$ e anti-$Jk^b$ estão implicados em reações pós-transfusionais graves e alguns casos de DHPN. O anti-$Jk^a$ é o mais perigoso dos anticorpos imunes, ocasionando muitas vezes reações fatais. O anti-$Jk^b$ é mais raro que o anti-$Jk^a$ e tem sido usualmente encontrado em soro de pacientes que possuem outros anticorpos irregulares. Diversos casos foram relatados de anemias hemolíticas auto-imunes por anti-$Jk^a$, sendo alguns relacionados ao uso de metildopa.

Comportamento sorológico: as reações entre os antígenos Kidd e os anticorpos são fracas, com efeito de dose, e de difícil detecção, sendo o teste de antiglobulina poliespecífica a melhor prova de rotina. O uso de enzimas e hemácias de indivíduos homozigotos para o gene em questão pode melhorar sua identificação. O título desses anticorpos decresce rapidamente, sendo indicado o uso de amostras recém-colhidas.

---

6 Por serem de difícil detecção, os anticorpos Kidd muitas vezes podem passar despercebidos em testes pré-transfusionais, ocasionando resposta anamnéstica, com reação transfusional hemolítica do tipo tardia. Portanto, recomenda-se verificar os registros anteriores dos pacientes. Fenotipar bolsa em caso de identificação positiva.

## Sistema Lewis (007)

- Símbolo do sistema: LE
- Nome do gene: *FUT3*
- Gene associado: *FUT2 (secretor)*
- Classificação ISBT: 007
- Número de antígenos associados: o sistema Lewis é composto por seis antígenos: $Le^a$, $Le^b$, $Le^{ab}$, $Le^{bH}$, $ALe^b$, $BLe^b$.
- Localização cromossômica: o *locus* Lewis (*FUT3*) está no cromossomo 19p-13.3, ligado ao *locus* C3 (complemento).

A expressão fenotípica dos antígenos Lewis depende do gene *Lewis* e do gene secretor (*FUT2*), que são herdados independentemente.

Aspectos bioquímicos e bases moleculares: os sistemas ABO, H e LE são considerados associados, uma vez que seus antígenos são partes de moléculas complexas que possuem as especificidades ABO, H e Lewis. Os antígenos que compõem esses sistemas estão presentes nos glicolipídeos e glicoproteínas membranares de diversos tecidos, além das hemácias, devendo ser considerados antígenos de histocompatibilidade.

Os genes *FUT2* e *FUT3* produzem duas enzimas (fucosiltransferases) que agem sobre a mesma substância de base, produzindo, respectivamente, os antígenos $Le^a$ e H, cuja interação produz a especificidade $Le^b$.

Distribuição e freqüência dos antígenos: os antígenos Lewis diferem dos demais por serem adsorvidos secundariamente às hemácias. São marcadores tissulares, formando um sistema de antígenos solúveis no plasma e na saliva. Esses antígenos são sintetizados pelas células epiteliais e mesodérmicas, sendo adsorvidos pelas hemácias a partir do plasma. Antígenos Lewis já foram identificados em linfócitos e plaquetas. Apesar de serem produzidos durante a vida fetal, ao nascimento a expressão dos antígenos nas hemácias é mínima, e a maioria dos RN apresenta fenotipagem eritrocitária Le(a-b-). Por volta dos 2 meses de idade começa a produção do antígeno $Le^a$ e, aos 6 anos de idade, a expressão do antígeno $Le^b$ alcança os níveis encontrados em adultos. A enzima fucosiltransferase adiciona uma fucose ao antígeno H em secreções para produzir o antígeno $Le^b$, ou se o antígeno H não estiver presente (em indivíduos não-secretores), adiciona fucose ao precursor do antígeno H, formando antígeno $Le^a$. Portanto, a maioria dos indivíduos H secretores apresen-

ta o fenótipo Le(a-b+) e os não-secretores Le(a+b-). Além dos antígenos $Le^a$ e $Le^b$, temos $Le^{ab}$, $Le^{bH}$, $ALe^b$, $BLe^b$.

Os indivíduos de fenótipo $A_1$ possuem menor quantidade de antígenos Lewis que $A_2$, que, por sua vez, possuem menor quantidade que os indivíduos O. Isso reflete a competitividade das enzimas ABO e Lewis pela substância precursora.

Relembrando a biossíntese dos antígenos ABO, H e Lewis solúveis:

- As glicoproteínas dos líquidos biológicos, como saliva, por exemplo, constituem a melhor maneira de análise dessas substâncias.
- Glicosiltransferases específicas são produzidas a partir dos genes dos sistemas ABO, H e LE.
- Genes alelos conhecidos como secretores (*FUT2*) não são ativos nos eritroblastos. Apesar disso, indivíduos não-secretores podem apresentar os antígenos ABO e H nas hemácias.
- O gene secretor (*FUT2*) é responsável pela formação de uma enzima 2-alfa-fucosiltransferase, que adicionará uma fucose à substância precursora, produzindo o antígeno H solúvel (que é imprescindível também para a formação dos antígenos A e B nas células secretoras). Essa enzima é ativa sobre cadeias precursoras dos tipos 1 e 2.
- Os indivíduos *sese* são chamados "não-secretores". O gene *secretor* não afeta a formação de antígenos ABO e H nos eritroblastos. Indivíduos não-secretores terão expressão normal dos antígenos ABO e H nos eritrócitos.
- Cerca de 80% da população caucasóide é constituída de indivíduos secretores.
- O gene *secretor* é também importante na formação dos fenótipos Lewis.

***Esquema da biossíntese das substâncias solúveis***

- As células da mucosa salivar produzem substâncias precursoras dos tipos 1 e 2, e as do tipo 1 apresentam ligação do tipo 1-3 entre a Gal β e a GlcNac, e, por isso, apresentam ligação livre no carbono 4 da GlcNac.

- O gene Lewis (*FUT3*) produz uma enzima do tipo 4-alfa-fucosiltransferase. Esta ligará uma fucose nesse carbono 4 livre, produzindo o antígeno Lea.
- Pela atividade da enzima produzida pelo gene secretor (*FUT2*), 2-alfa-fucosiltransferase, outra fucose é ligada ao carbono 2 da Gal β, produzindo o antígeno H.
- A especificidade conhecida como antígeno $Le^b$ é, na verdade, a interação dessas duas especificidades ($Le^a$+H), nos indivíduos *LeSe*.
- As enzimas A e B produzirão, então, os fenótipos ABO da mesma maneira que nos eritroblastos.

Características sorológicas: a melhor maneira de determinarmos a presença das glicoproteínas ABO, H e Lewis é a pesquisa em saliva. Os antígenos Lewis devem ser pesquisados em amostras recentes, já que esses podem eluir com o passar do tempo.

TABELA 10. DETERMINAÇÃO GENÉTICA DOS ANTÍGENOS ABO E LEWIS

| Genes herdados | Substâncias solúveis | Fenótipo eritrocitário |
|---|---|---|
| Le, Se, H, ABO | $Le^a$*, $Le^b$, A, B, H | ABO, Le(a-b+) |
| lele, Se, H, ABO | A, B, H | ABO, Le(a-b-) |
| Le, sese, H, ABO | $Le^a$ | ABO, Le(a+b-) |
| lele, sese, H, ABO | - | ABO, Le(a-b-) |
| Le, Se, hh, ABO | $Le^a$*, $Le^b$, A, B, H | Obombay, Le(a-b+) |
| Le, sese, hh, ABO | $Le^a$ | Obombay, Le(a+b-) |

** presente em baixíssimas concentrações*

Fonte: L. Melo & J. A. Santos, "Sistemas ABO, Hh e Lewis", em *STD*, vol. 4, Belo Horizonte, 1996.

### *Anticorpos Lewis*

Significado clínico: são geralmente IgM, que, não atravessando a barreira placentária, não ocasionam DHPN. Além disso, as hemácias fetais não apresentam antígenos Lewis.

Em geral fixam complemento. São normalmente de ocorrência natural, encontrados sobretudo em indivíduos Le(a-b-) e sem atividade a 37 °C (sem significado clínico). Se reativos a 37 °C são capazes de fixar complemento e causar quadro hemolítico severo.

Importante: indivíduos com fenótipo Le(a-b+) não produzem anti-$Le^a$, já que alguma quantidade de antígeno $Le^a$ pode ser detectada, por não haver sido convertida em $Le^b$.

Comportamento sorológico: reatividade aumentada com hemácias tratadas por enzimas proteolíticas. Reativos preferencialmente entre 4 °C e 22 °C, podendo apresentar reatividade a 37 °C e fase de AGH, por efeito residual da reação à temperatura ambiente. Recomenda-se preaquecimento do teste para determinação de seu significado clínico, e eventualmente tratamento do soro com reagentes thiol (2-ME ou DDT).

## Sistema MNS (002)

- Símbolo do sistema: MNS
- Nome dos genes: *GYPA, GYPB, GYPE*
- Classificação ISBT: 002
- Número de antígenos associados: é o segundo sistema em diversidade antigênica, depois do Rh. Sistema complexo de 43 antígenos.[7] O sistema possui muitos antígenos de baixa freqüência, associados a glicoforinas híbridas anormais, resultantes de glicosilações das GPA/B.
- Localização cromossômica: os antígenos deste sistema são codificados por dois genes *GYPA* e *GYPB*, altamente homólogos e pela região 3′ de um terceiro gene homólogo, *GYPE*, no cromossomo 4q28-q31. Contêm aproximadamente 350 kb e formam *cluster* gênico (5′-*GYPA-GYPB-GYPE*-3′).

Histórico: os antígenos M e N foram descobertos por Landsteiner, em 1927. Em 1947, foi descrito o antígeno S e em 1951, seu antitético s. Em 1953, foi relatada a existência de um antígeno de alta freqüência denominado U, comum em 100% da população branca e em 98,5% dos negros.

Bases moleculares: os antígenos do sistema MNS estão associados às sialoglicoproteínas (SGP) da membrana eritrocitária, denominadas glicoforina A (GPA) e glicoforina B (GPB), transmembranárias. São glicoproteínas presentes em grande quantidade no eritrócito e contêm aproximadamente 50% de carboidratos. (Figura 4)

---

7 G. Daniels *et al.*, "ISBT Working Party Oslo Report", cit.

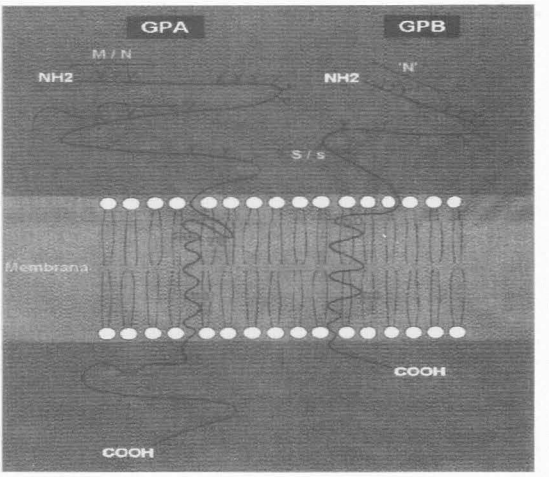



FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS GLICOFORINAS A E B (SISTEMA MNS).

A GPE não é expressa em condições normais; entretanto, o gene *GYPE* participa de rearranjos gênicos, fazendo surgir as formas alélicas variantes. A base molecular da formação da maioria dos antígenos desse sistema foi determinada devido à substituição de nucleotídeos, perda de éxons ou mecanismos de recombinação gênica que dão origem a glicoforinas híbridas, GPA e GPB.

- Os antígenos M e N estão localizados na GPA, seqüência de 131 aminoácidos, e diferem entre si em apenas dois aminoácidos:
  - M: serina (pos. 1) e glicina (pos. 5);
  - N: leucina (pos. 1) e ácido glutâmico (pos. 5).
- Os antígenos S, s e U estão localizados na GPB, que é menor que a GPA (72 aminoácidos), e S e s diferem em simples substituição de aminoácido na posição 29:
  - S: metionina / s: treonina

Funções fisiológicas: a função das SGP parece ser a de manter as hemácias afastadas entre si, participando da cobertura de carboidratos (glicocálice) da membrana, e impedindo agregação espontânea dos eritrócitos; portanto, são importantes na manutenção do potencial zeta de repulsão interglobular. Alguns autores relatam que podem também ser

receptoras para complemento, citocinas, bactérias, vírus e *Plasmodium falciparum*.

Distribuição e freqüência dos antígenos: a maioria dos antígenos do sistema MNS estão bem desenvolvidos ao nascimento, e parecem ser restritos à linhagem eritróide. Envolvidos, portanto, com casos de DHPN. Os antígenos podem estar em doses simples ou dupla: MM, NN, MN, SS, Ss, ss. Em negros podemos encontrar o fenótipo S-s-. Também não apresentarão o antígeno de alta freqüência U, ou sua expressão estará diminuída.

Fenótipos raros: fenótipo En(a-): são GPA negativos (M-N-). São raros também os indivíduos *null* (Mk), que não possuem GPA ou GPB.

Associação com doenças: nenhuma conhecida, pois indivíduos de fenótipos En(a-) (GPA-) e $M^k$ (GPA e B-) apresentam eritrócitos com sobrevida normal.

Características sorológicas: os antígenos M/N e S/s são antitéticos. Possuem efeito de dose, reagindo melhor com hemácias de indivíduos homozigotos para o gene em questão. Os antígenos M, N, S e s são geralmente destruídos com tratamento por enzimas proteolíticas, exceto S, s, N, pois são tripsina-resistentes. Às vezes o S não é totalmente destruído pelo tratamento com ficina ou papaína.

TABELA 11. PRINCIPAIS GENÓTIPOS E FENÓTIPOS DO SISTEMA MNS

| Reações com anti-soros | | | | Fenótipos | Genótipos | Freqüência caucasianos |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Anti-M | Anti-N | Anti-S | Anti-s | | | |
| + | - | + | - | MS | MS/MS | 7,3% |
| + | - | + | + | MSs | MS/Ms | 16,2% |
| + | - | - | + | Ms | Ms/Ms | 9,0% |
| + | + | + | - | MNS | MS/NS | 4,0% |
| + | + | + | + | MNSs | MS/Ns | 19,2% |
| + | + | + | + | MNSs | Ms/NS | 4,5% |
| + | + | - | + | MNs | Ms/Ns | 21,3% |
| - | + | + | - | NS | NS/NS | 0,6% |
| - | + | + | + | NSs | NS/Ns | 5,3% |
| - | + | - | + | Ns | Ns/Ns | 12,6% |

Fonte: J. A. Santos. Curso de atualização em imuno-hematologia eritrocitária, cit.

Outros antígenos: estão representados na tabela a seguir.

TABELA 12. OUTROS ANTÍGENOS DO SISTEMA MNS

| | | | |
|---|---|---|---|
| Mg | He | Mia | Mc |
| MINY | Vw | Mur | Vr |
| MUT | Me | Mta | Sta |
| SAT | Ria | Cla | Nya |
| ERIK | Hut | Hil | Mv |
| Osa | Far | Sd | Mit |
| ENAV | Dantu | Hop | Nob |
| MARS | ENKT | Or | DANE |

### *Anticorpos MNS*

Significado clínico: o anti-M é um anticorpo geralmente natural e irregular, que reage melhor a 4 °C, mas podendo reagir fracamente a 37 °C. São quase sempre IgM, mas em grande parte apresentam associação IgG + IgM. Normalmente não fixam complemento, mas IgM potentes e reativas a 37 °C podem causar reações hemolíticas agudas e tardias. Raramente causam DHPN. De modo geral, o anti-M não é clinicamente significativo, tendo pouca importância na transfusão. Sua atividade pode ser potencializada pelo uso de albumina ou meio de pH reduzido.

O anti-N apresenta características sorológicas semelhantes ao anti-M, embora seja mais raro. Geralmente são de ocorrência natural, apresentam efeito de dose, e inativos em temperaturas superiores a 25 °C. Uma especificidade anti-Nf (ou N-*like*) pode ser observada em pacientes submetidos à hemodiálise, em aparelhos esterilizados por formaldeído.

Os anticorpos anti-S, anti-s e anti-U, ao contrário, são clinicamente significativos e produzidos por aloimunizações.

O anti-S pode ser eventualmente de ocorrência natural (IgM). O anti-s é um anticorpo mais raro e imune (IgG). O anti-U é extremamente raro, imune e capaz de causar hemólise pós-transfusional grave (todas as hemácias U negativas são S e s negativas). Devemos lembrar que esse fenótipo ocorre em indivíduos de raça negra, já transfundidos e/ou com história gestacional, que desenvolvem anticorpo contra antígeno de alta freqüência.

Outros anticorpos: anticorpos contra antígenos de baixa freqüência são raramente identificados, mas podemos suspeitar quando encontramos DHPN de leve intensidade ou provas incompatíveis inexplicáveis.

## Sistema Diego (010)

- Símbolo do sistema: DI
- Nome do gene: SLC4A1
- Classificação ISBT: 010
- Número de antígenos associados: 21, sendo antígenos de baixa ou alta freqüência.[8] Os mais conhecidos são $Di^a/Di^b$ e $Wr^a/Wr^b$.
- Localização cromossômica: os antígenos desse sistema são codificados por um gene *SLC4A1*, localizado no cromossomo 17q21-q22, com 15 éxons.

Histórico: em 1955, Layrisse *et al.* descreveram um caso de DHPN causada por anticorpo contra antígeno de baixa freqüência (anti-$Di^a$). Em 1953, Holman descreveu outro antígeno de baixa freqüência, $Wr^a$.

Bases moleculares: a Banda 3 (AE1) é uma glicoproteína (N-glicosilada), mutipasso (14x) e possui 403 aminoácidos no domínio N-terminal citoplasmático, 479 aa no domínio transmembranar e 29 aa no domínio C-terminal citoplasmático. Seu peso molecular é de 100 kDa e apresenta cerca de $10^6$ cópias na membrana eritrocitária. (Figura 5)

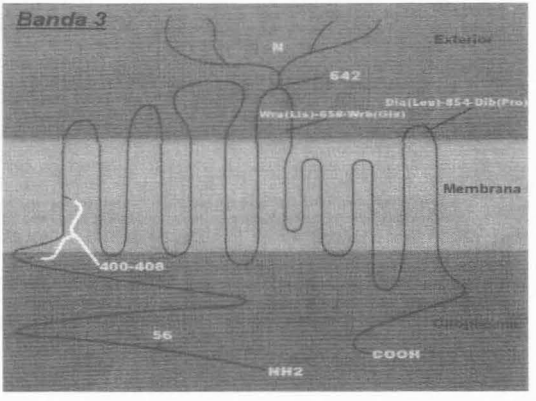



Figura 5. Representação esquemática da proteína Banda 3.

[8] G. Daniels, *Blood Group Terminology*, http://www.iccbba.com/wpantigentables.htm, revisado em setembro de 2000.

Os fenótipos $Di^a/Di^b$ resultam de uma mutação de ponto (2561 C>T), que provoca uma substituição de aa prolina ($Di^b$) para leucina ($Di^a$) na posição 854 da proteína.

Estudos recentes demonstraram que o alelo $Di^a$ apresenta mutações, que causam novos pontos de polimorfismo na proteína Banda 3, com substituição de lisina por ácido glutâmico na posição 56, e que foram denominadas Memphis e Memphis II. Estudos recentes mostram que 76% dos índios brasileiros apresentam o alelo $Di^a$; 85% apresentavam essa mutação.

Funções fisiológicas: já se comprovou a dupla função biológica da Banda 3, estando ligada à troca de ânions ($HCO_3^-$ e $Cl^-$) e à manutenção da integridade celular pela ligação do seu domínio N-terminal citoplasmático ao citoesqueleto.

Além disso, parece estar implicada na formação dos antígenos senescentes, ou seja, marcadores de hemácias velhas que devem ser retiradas da circulação pelos macrófagos do SMF. A exata estrutura desses antígenos ainda não está elucidada.

Parecem também fazer parte do complexo de adesão do parasita da malária à superfície dos eritrócitos, e da adesão destes ao endotélio vascular.

Distribuição e freqüência dos antígenos: a banda 3 (AE1) expressa 21 antígenos, sendo os pares antitéticos $Di^a/Di^b$ e $Wr^a/Wr^b$ os mais conhecidos. (Tabela 13)

- $Di^a$ e $Wr^a$: baixa freqüência;
- $Di^b$ e $Wr^b$: alta freqüência;
- mais 17 antígenos de baixa freqüência: $Wd^a$, $Rb^a$, WARR, ELO, Wu, $Bp^a$, $Mo^a$, $Hg^a$, $Vg^a$, $Sw^a$, BOW, NFLD, $Jn^a$, KREP, $Tr^a$, $Fr^a$, SW1.

O antígeno $Di^a$ é predominante entre indivíduos de origem asiática. A frequência do antígeno $Di^a$ é maior em índios sul-americanos (36%), e 5% a 15% dos japoneses e chineses. Estudos mostraram que a incidência deste antígeno é de 1:4.462 europeus; 1:827 negros americanos; 1:1.374 aborígenes australianos; 4,6% de japoneses; 6,1% de coreanos; 10,2% de mexicanos (dos Estados Unidos) e 20,4% de indígenas mexicanos. No Brasil, temos estudos que comprovam a incidência desse fenótipo nos indígenas, sendo 54% em caingangues, 36,1% em carajás.[9]

---

[9] P. D. Issit & D. J. Anstee, *op. cit.*

Tabela 13. Antígenos do sistema Diego

| ISBT | Nomenclatura clássica | Freqüência relativa | Bases moleculares do polimorfismo |
|---|---|---|---|
| DI1 | $Di^a$ | Baixa | Leucina - pos. 854 |
| DI2 | $Di^b$ | Alta | Prolina - pos. 854 |
| DI3 | $Wr^a$ | Baixa | Lisina - pos. 658 |
| DI4 | $Wr^b$ | Alta | Glutamato - pos. 658 |
| DI5 | $Wd^a$ | Baixa | - |
| DI6 | $Rb^a$ | Baixa | - |
| DI7 | WARR | Baixa | - |
| DI8 | ELO | Baixa | - |
| DI9 | Wu | Baixa | - |
| DI10 | $Bp^a$ | Baixa | - |
| DI11 | $Mo^a$ | Baixa | - |
| DI12 | $Hg^a$ | Baixa | - |
| DI13 | $Vg^a$ | Baixa | - |

Associação a doenças: a deficiência de Banda 3 é responsável por uma grande parte dos casos de esferocitose hereditária, pois a porção N-terminal da proteína associa-se com o citoesqueleto de actina-espectrina, para manutenção da morfologia celular.

### *Anticorpos Diego*

Significado clínico: geralmente de origem imune, classe IgG, subclasses IgG1 e 3, sendo bons fixadores de complemento.

Anti-$Di^a$ pode ser de ocorrência natural. Podem estar envolvidos em reações transfusionais imediatas e tardias e DHPN.

Os primeiros casos de anti-$Di^b$ foram relatados em 1967.

Devido à crescente freqüência de anti-$Di^a$ em nossa população receptora e aumento da freqüência do antígeno na população doadora, a triagem sorológica é indicada pelo uso de hemácias comerciais positivas para $Di^a$.[10]

[10] *Ibidem.*

Comportamento sorológico: reagem melhor em fase de antiglobulina humana. Alguns exemplares de anti-$Di^a$ e anti-$Di^b$ reagem melhor com hemácias tratadas por proteases.

# Doença hemolítica perinatal

8

## Introdução

Anemias hemolíticas são causadas por um aumento da destruição de glóbulos vermelhos e podem ser devidas a diversas causas, entre as quais podemos citar como exemplo hemoglobinopatias, enzimopatias eritrocitárias, alterações de membranas celulares das hemácias e anemias hemolíticas de origem imunológica, como as anemias hemolíticas auto-imunes (AHAI), que serão discutidas no capítulo 9, e a doença hemolítica neonatal por incompatibilidade sangüínea materno-fetal.

Passando o enfoque para o recém-nato, de acordo com Humbert,[1] na atualidade o grupo de anemias neonatais mais comuns são as anemias hemolíticas, incluindo:

- as incompatibilidades pelos antígenos de grupos sangüíneos ABO, que são mais freqüentes, e Rh(D), que tendem a desaparecer com a administração da imunoglobulina anti-D como profilaxia;
- esferocitose hereditária,
- deficiência de G-6-PD.

---

[1] J. Humbert & P. Warcker, "Common Anemias in Neonatology", em *Schweiz Rundsch Med Prax*, 88(5), 1999.

Por definição, na anemia hemolítica ocorre o encurtamento da sobrevida dos eritrócitos, que normalmente está estipulada em torno de 120 dias para o adulto, 60 a 80 dias para o neonato a termo e pode ser de somente 20 a 30 dias para os prematuros, entre 30 e 32 semanas de gestação. Por isso, o diagnóstico da anemia hemolítica no período de recém-nascimento é complexo, e, devido a uma destruição fisiológica intensa, é necessária a avaliação conjunta de vários critérios.

Doença hemolítica perinatal (DHPN) pode ocorrer por dois mecanismos imunológicos: aloimunização materna, por incompatibilidade com antígenos de grupos sangüíneos do feto, ou incompatibilidade ABO entre os antígenos ABO fetais e os anticorpos naturais e regulares maternos.

Esses anticorpos são de classe IgG e, assim, podem atravessar a barreira placentária e recobrir os eritrócitos fetais, acelerando sua destruição, antes e depois do nascimento. Porém, a severidade clínica da doença pode variar, desde casos graves de morte intra-uterina até anormalidades hematológicas detectadas somente se o sangue de um recém-nato aparentemente saudável for sorologicamente testado.

## Fisiopatologia da doença hemolítica do recém-nascido ou perinatal

### Por aloanticorpos maternos

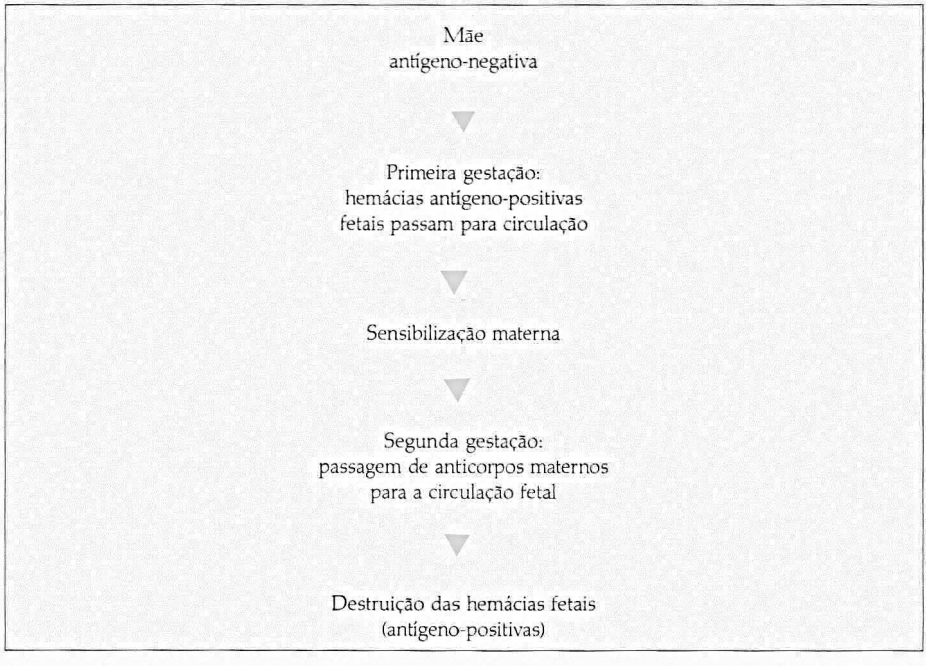
Na aloimunização materna, a mãe produz um aloanticorpo contra um antígeno eritrocitário fetal herdado geneticamente do pai, que está ausente nos glóbulos vermelhos maternos, como se pode ver no esquema da próxima página.

### Por anticorpos regulares ABO

Já a sensibilização ABO decorre de estímulos inespecíficos por ocasião de vacinas, processos gastroentéricos e da absorção de substâncias grupo-específicas do tipo A e/ou B existentes no líquido amniótico da gestante de feto incompatível e secretor.[2] Os indivíduos produzem anticorpos em maior quan-

[2] F. Ghilardi *et al.* "Análise clínica laboratorial na sensibilização eritrocitária perinatal com a realização de estudo imunohematológico pela gel-centrifugação", em *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 17(170), 1995, pp. 59-63.

MECANISMO DE SENSIBILIZAÇÃO DA MÃE POR GESTAÇÃO




tidade de classe IgM contra os antígenos do sistema ABO (ver capítulo 5, "Sistemas ABO e Hh").

Porém, indivíduos de fenótipo O produzem, em maior quantidade, anticorpos IgG da especificidade anti-AB.

Esses anticorpos de classe IgG podem atravessar a barreira placentária e recobrir os eritrócitos fetais, acelerando sua destruição, antes e depois do nascimento. Entretanto, a severidade clínica da doença pode variar, desde casos graves de morte intra-uterina (raros) a anormalidades hematológicas detectadas somente se o sangue de um recém-nato aparentemente saudável for sorologicamente testado (freqüente).

O aumento de destruição eritrocitária inicia-se já no período intra-uterino, por isso, atualmente, prefere-se utilizar o termo *doença hemolítica perinatal* (DHPN), ou seja, em torno do período de nascimento.

A destruição acelerada dos glóbulos vermelhos do feto ou recém-nascido estimula um aumento da eritropoiese, podendo ser observada a presença de células nucleadas em sua circulação (eritroblastos); por isso o termo também utilizado é eritroblastose fetal.

## Fisiopatologia no período intra-útero

Fetos severamente acometidos podem desenvolver hidropsia fetal, cuja patogênese não está claramente definida. Sabe-se que em DHPN severa, a eritropoiese no fígado pode ser tão intensa que a circulação portal é interrompida e a síntese de albumina é prejudicada, promovendo, assim, uma redução da pressão osmótica coloidal do plasma e desequilibrando a hemodinâmica, levando à anemia, falência cardíaca e hipóxia tissular.[3] Sem tratamento, o feto pode morrer intra-útero. A transfusão intra-útero pode salvar sua vida nessas circunstâncias. Se sobreviver, a criança afetada severamente pode exibir anemia profunda e falência cardíaca.

Antes do nascimento, devido à comunicação entre a circulação feto-materna, a bilirrubina é processada no fígado materno e, dessa forma, o aspecto mais deletério para o feto é a anemia, e secundariamente a hiperbilirrubinemia.

## Fisiopatologia após nascimento

Após o nascimento, o fígado imaturo é incapaz de conjugar a quantidade aumentada de bilirrubina proveniente da destruição das células recobertas por anticorpos, e produto final do catabolismo do grupo HEME da hemoglobina; assim, seu excedente pode atravessar a barreira hematoencefálica e se depositar no SNC, lesando-o. As conseqüências da hiperbilirrubinemia nesse período apresentam maior perigo que a anemia, que pode ser mais facilmente controlada. Prematuridade, acidose, hipóxia, hipoalbuminemia aumentam o perigo para o SNC nesses casos.

Crianças afetadas menos severamente têm a destruição acelerada dos eritrócitos, o que geralmente aumenta a quantidade de bilirrubina. No sangue, a bilirrubina está ligada à albumina. Nessa forma, a bilirrubina não pode cruzar a barreira hematocefálica, enquanto a forma não conjugada livre pode entrar no sistema nervoso central (SNC), causando lesões irreversíveis (*kernicterus*). Ao ser captada pelo hepatócito, ocorre ligação com proteínas (ligandina, proteína Z etc.) e, pela ação da glicuroniltransferase, dá-se sua conjugação com o ácido glicurônico. Esse com-

---

[3] American Association of Blood Banks, *Technical Manual* (12ª ed. Bethesda: AABB, 1996).

posto hidrossolúvel poderá agora ser excretado pela urina, e mais rapidamente pela bile.

Em recém-nascidos normais, pode ocorrer icterícia fisiológica, causada por uma sobrecarga de bilirrubina nos hepatócitos, insuficientes ou ainda imaturos para a conjugação e excreção da bilirrubina. Essas causas são transitórias e consideradas normais, com exceção de prematuros extremos (menos de 1.500 g) e em RN com doença hemolítica grave.

A icterícia clínica é visível quando os níveis séricos de bilirrubina se aproximam de 5 a 7 mg%. A icterícia é freqüentemente vista pela face, especialmente o nariz, prosseguindo caudalmente:

- valores aproximados de até 10 mg% de bilirrubina indireta quando a icterícia atinge toda a face;
- entre 10 e 13 mg% quando a icterícia cobre face e tronco;
- de 12 a 15 mg% quando atinge a face, tronco, abdômen e raiz dos membros;
- e entre 15 e 20 mg% quando todo o corpo está ictérico, cobrindo face, tronco, abdômen e membros, passando os joelhos e cotovelos.[4]

Os achados físicos são úteis para complementação dos achados laboratoriais e diagnóstico.

## Classificação da doença hemolítica perinatal (DHPN)

Segundo o manual técnico, da Associação Americana de Bancos de Sangue,[5] a doença hemolítica perinatal é freqüentemente classificada em três categorias, com base na especificidade do anticorpo IgG que a promoveu. São elas:

1. Doença hemolítica por D, causada pelo anticorpo anti-D sozinho ou, em menor freqüência, quando combinado com anti-C ou anti-E (ambos do sistema Rh).

---

4 F. Ghilardi *et al.*, *op. cit.*

5 American Association of Blood Banks, *Technical Manual* (Bethesda: AABB, 1999).

2. Doença hemolítica por ABO, usualmente devido ao anti-AB, um anticorpo IgG presente no soro de mulheres do grupo O. Mais raramente, pode ser devido a IgG anti-A ou anti-B.
3. Doença hemolítica por outros anticorpos, causada por outros anticorpos do sistema Rh, que não o anti-D, ou anticorpos contra antígenos de outros sistemas. Anti-c e anti-K são mais freqüentemente implicados.

Em todas, exceto na doença hemolítica por incompatibilidade ABO, os anticorpos maternos são decorrentes de aloimunização devida a gestação ou transfusão prévias. Na doença hemolítica do recém-nascido por incompatibilidade ABO, essa condição não pode ser diagnosticada durante a gestação, e a criança é raramente sintomática no nascimento.

## Doença hemolítica do recém-nascido ou perinatal por presença de anticorpos anti-D maternos

### Etiologia

Mulheres grávidas ou em idade fértil de fenótipo Rh(D) negativo, que receberão transfusão sangüínea, devem ser encaradas como indivíduos que potencialmente podem produzir anti-D. Como discutimos no capítulo de Rh, o antígeno D é altamente imunogênico, e pequenas quantidades de hemácias (alguns autores citam volumes de até 1 ml de sangue incompatível) podem desencadear a formação de anti-D. Uma vez produzido o anticorpo anti-D (que pode estar associado a outro anticorpo, sendo os mais freqüentes anti-C e/ou anti-E), e se essa mulher gerar posteriormente uma criança de fenótipo Rh(D) positivo, esse anticorpo atravessa a barreira placentária, ligando-se a hemácias fetais, aumentando o processo de destruição. Essa é a mais conhecida causa de DHPN, já que é a mais freqüentemente encontrada.

Existem vários fatores que podem limitar a sensibilização materna. Vamos comentar sobre a profilaxia utilizando a imunoglobulina anti-D e a proteção por incompatibilidade materno-fetal ABO.

### *O que é proteção ABO e como ela limita a sensibilização materna?*

Quando ocorre a passagem de eritrócitos fetais para a corrente circulatória materna, o sistema imune pode reconhecer ou não estruturas da membrana eritrocitária como não-próprias (*non-self*) e, dessa forma, desencadear a produção de resposta imune. Porém, essa fase de reconhecimento envolve algumas etapas. Se o eritrócito for retirado rapidamente de circulação, essas estruturas podem não ser reconhecidas e, desse modo, não ocorrer a sensibilização materna. Assim, por exemplo, uma mulher de fenótipo O Rh(D) negativo gera uma criança A Rh(D) positiva: se hemácias fetais passarem para a circulação materna, serão rapidamente destruídas por anticorpos IgM anti-A fixadores de complemento, impossibilitando que o sistema imune reconheça o antígeno Rh(D). No entanto, se a mesma mãe gerar uma criança de fenótipo O Rh(D) positivo, eritrócitos fetais na corrente circulatória materna podem promover sua sensibilização.

### *O que é prevenção de imunização por imunoglobulina anti-D?*

Para evitar a produção de anticorpos anti-Rh(D) durante a gestação, quando a mulher é Rh(D) negativa e a criança que está sendo gerada ou recém-nascida é Rh(D) positiva, administra-se imunoglobulina anti-Rh(D). Essa profilaxia promove uma proteção de 98% a 99%, quando administrada uma dose adequada de imunoglobulina anti-Rh(D) até 72 horas após o parto. Molisson e colaboradores descreveram que doses de 20mg de anti-Rh (D) em cada 1 ml de hemácias Rh(D) positivas presentes na circulação materna pode promover a proteção desta.[6] Para saber a dose adequada de anti-Rh (D) a ser administrada, sugere-se realizar o teste de quantificação da hemorragia materno-fetal pelo método de Kleihauer, também chamado de teste de resistência ácida da hemoglobina fetal-HbF, podendo ser calculada, assim, a dose efetiva. Em alguns serviços esse teste não é realizado e, dessa forma, para evitar sensibilização, administram-se altas doses (geralmente 300 μg) de anti-Rh(D).

Antes do advento da profilaxia com imunoglobulina anti-Rh(D), a freqüência de mulheres grávidas que nunca receberam transfusão sangüínea, e

---

6 P. L. Mollison *et al.*, *Blood Transfusion in Clinical Medicine* (8ª ed. Londres: Blackwell Scientific Publications, 1987), pp. 676-684.

que produziam anti-Rh(D) durante a primeira gestação, era ao redor de 1%, considerando o grupo de risco, isto é, de mães Rh(D) negativas que geravam crianças Rh(D) positivas.

Em mulheres Rh(D) negativas que geraram duas ou mais crianças Rh(D) positivas e que a imunoglobulina anti-Rh(D) não havia sido administrada, cerca de 15% a 20% produziram anti-Rh(D). Esse fato reforçou a idéia de que a produção de anti-Rh(D) se dá principalmente durante o parto, sendo um evento incomum durante a gestação.

Quando uma mãe já se imunizou, esse tipo de tratamento não é mais necessário, já que sua única função é evitar a sensibilização prévia da mãe.

### *Como os anticorpos atravessam a barreira placentária?*

A transferência placentária de anticorpos maternos para a corrente circulatória do feto é um evento essencialmente fisiológico. Como o sistema imunológico do recém-nascido está funcionalmente imaturo, a transferência de anticorpos da mãe serve para proteção da criança contra possíveis infecções durante os primeiros meses de vida. Os anticorpos IgG atravessam a barreira placentária, o mesmo não ocorrendo para os anticorpos de classe IgM e IgA. Sabemos também que se trata de um processo de transporte ativo à custa de receptores contidos nas células placentárias.

Quando o soro da mãe contém anticorpos IgG contra antígenos de grupo sangüíneo do feto, sabe-se que durante as primeiras doze semanas de gestação somente poucas quantidades de IgG entram na circulação fetal, mas, quando a mãe tem em seu soro um potente anti-Rh(D), o TAD dessa criança pode apresentar-se positivo precocemente já na 6ª à 10ª semana de gestação.

## Aspectos laboratoriais

Geralmente podemos observar hiperbilirrubinemia (com bilirrubinas em torno de 18 a 20 mg%) e reticulocitose. Esses dados laboratoriais podem variar de acordo com a gravidade do caso. Como já citamos, no hemograma podemos observar a presença de células jovens da linhagem eritrocitária (eritroblastos).

Teste de antiglobulina direto de amostras de recém-nascidos acometidos por DHPN por incompatibilidade Rh costumam apresentar-se positivos, e

métodos de eluição de anticorpos quentes são normalmente utilizados para confirmação da especificidade do anticorpo (técnicas de eluição por alteração de pH e por solventes orgânicos são as mais utilizadas).

O título do anticorpo anti-Rh(D) parece ser um importante dado laboratorial para essa incompatibilidade, muitas vezes diferindo de outros tipos de incompatibilidade materno-fetal, como, por exemplo, nos casos promovidos por anti-K. Como podemos observar, em casos em que verificamos altos títulos de anti-Rh(D) materno, e esses anticorpos ligando-se exclusivamente aos eritrócitos fetais (já que os antígenos Rh são exclusivamente eritrocitários), a fenotipagem ABO e Rh do recém-nato pode estar prejudicada pela interferência destes anticorpos, sendo necessária a utilização de técnicas auxiliares como a solução de cloroquina (que dissocia anticorpos IgG interferentes e possibilita a fenotipagem eritrocitária).

### Severidade da doença

A doença hemolítica perinatal causada por anti-Rh(D) é severa, na maioria dos casos. Isso se deve à alta imunogenicidade do antígeno Rh(D) e à possibilidade de produção de altos títulos do anticorpo, promovendo destruição acentuada de hemácias do feto, podendo ser evidenciadas, em muitos casos, hiperbilirrubinemia, anemia profunda e hidropsia fetal, que muitas vezes pode evoluir para o óbito.

## Doença hemolítica do recém-nascido ou perinatal por incompatibilidade materno-fetal ABO

### Etiologia

Os primeiros relatos de doença hemolítica por incompatibilidade materno-fetal ABO foram apresentados na década de 1960. Em fevereiro de 1960, uma criança foi a óbito (apesar de ter sido realizada exsangüíneo-transfusão) devido a doença hemolítica por anti-A materno. Em abril de 1961 e novembro de 1962 mais dois relatos foram documentados de doença hemolítica por incompatibilidade ABO, porém ambas as crianças evoluíram bem após exsangüíneo-transfusão. Nesses dois últimos casos, os dados laboratoriais

eram quase os mesmos e o título dos anticorpos maternos eram praticamente iguais (4.096 e 8.192).

Os anticorpos anti-A e anti-B, que ocorrem em indivíduos do grupo B e A respectivamente, são em geral de classe IgM; diferentemente, nos indivíduos do grupo O, uma grande quantidade de anticorpos da classe IgG é encontrada. Além disso, nesses indivíduos encontramos um anticorpo complexo, inseparável, anti-AB, que reage tanto com hemácias A quanto B.

Apesar de, em aproximadamente 15% de todas as gestações de mulheres caucasianas, a mãe ser do grupo O e seus filhos do grupo A ou do grupo B, a doença hemolítica por ABO grave é um evento relativamente raro.

Existem duas razões para explicar o fato:

- primeiramente, antígenos A e B não estão bem desenvolvidos ao nascimento;
- as substâncias A e B não são exclusivamente eritrocitárias. Sendo assim, apenas uma pequena quantidade de anticorpos IgG anti-A e/ou anti-B que atravessam a placenta combina-se com as hemácias da criança (pois se ligam primariamente aos antígenos tissulares e solúveis).

Como exemplo, observou-se que crianças prematuras parecem estar protegidas de doença hemolítica perinatal por ABO devido, presumidamente, à quantidade de sítios antigênicos eritrocitários A e/ou B ser menor que em células de recém-natos a termo. Essa pequena quantidade de anticorpos fixados às hemácias pode ser evidenciada somente por meio da utilização de métodos sensíveis de pesquisa de anticorpos (eluição, TAD em cartelas de gel-teste centrifugação) e quando ocorre doença hemolítica por anticorpos anti-A e/ou anti-B, a destruição celular costuma ocorrer em menor grau, com o surgimento de icterícia leve e diminuição moderada da concentração de hemoglobina.

Em aproximadamente 50% de famílias nas quais a doença hemolítica por ABO é diagnosticada, a primeira criança ABO incompatível é afetada. Em famílias nas quais essa doença é moderada, uma criança afetada pode ser seguida por uma criança clinicamente não-afetada. Por outro lado, quando a doença é severa, as crianças subseqüentes com o mesmo grupo sangüíneo são semelhantemente acometidas.

Por meio do critério de desenvolvimento de icterícia com menos de 24 horas de nascimento, a incidência é de 1 para 180 nascimentos; essa incidência será de 1 para 70 nascimentos se considerarmos as 24 horas como critério.

***Existem diferenças de freqüência de doença hemolítica por incompatibilidade ABO de acordo com a origem étnica?***

Sim. Foi observado que a doença hemolítica perinatal por incompatibilidade ABO ocorre com uma freqüência diferente em crianças recém-nascidas negras e brancas. Essa diferença relativa foi inicialmente descrita por Kirkman, mas vários trabalhos posteriores confirmaram seus achados. Neste estudo estabeleceu-se que a freqüência relativa foi de 2 a 6 crianças negras para 1 criança branca. Essa variação da freqüência ocorre devido a critérios particulares escolhidos para o diagnóstico.

Porém, Peevy e Wiserman observaram que, uma vez estabelecida a doença hemolítica perinatal por ABO, nenhuma diferença de evolução clínica ou necessidade de fototerapia foi verificada em recém-nascidos negros ou brancos.[7]

Outros estudos apontam uma freqüência de ocorrência maior também em nigerianos, latino-americanos e árabes. Em nigerianos, a freqüência relativa da doença hemolítica por ABO chega a ser 5%. Já para crianças árabes, sua ocorrência é tão comum quanto para crianças negras, sendo sua severidade mais marcante (1 a cada 500 crianças árabes recém-nascidas recebiam exsangüíneo). Em latino-americanos, a freqüência dessa doença parece ser maior devido à miscigenação das raças.

## Aspectos laboratoriais

A técnica de eleição para testes com as IgG anti-A, anti-B e anti-AB das mães é tratar os seus soros com reagentes thiol (DTT ou 2-ME) e, assim, titular os mesmos na fase de antiglobulina indireta usando o soro anti-IgG. Em trabalhos que utilizaram essa técnica, títulos acima de 512 de anti-A e anti-B parecem ser sugestivos para desenvolvimento de doença hemolítica nos recém-nascidos por incompatibilidade ABO. Porém, a correlação entre

---

7 K. J. Peevy & H. J. Wiseman, "ABO Hemolytic Disease of the Newborn: Evaluation of Management and Identification of Racial and Antigenic Factors", em *Pediatrics*, nº 61, 1978, p. 475.

o título e a reatividade desses anticorpos na fase de antiglobulina humana e a intensidade da doença hemolítica não pode ser estabelecida, pelo fato de que os anticorpos IgG anti-A e anti-B muitas vezes são da subclasse IgG2, que é biologicamente inativa, independentemente do seu título.

Existe uma diferença significativa nos achados sorológicos entre uma criança acometida de doença hemolítica por incompatibilidade ABO e outra com doença hemolítica por incompatibilidade Rh. Nestas últimas, o teste de antiglobulina direto (TAD) pode ser fortemente positivo, sem ser observado nenhum sinal clínico da doença; já quando se apresenta incompatibilidade ABO, esse mesmo teste pode ser fracamente positivo, ou até negativo para crianças clinicamente afetadas. Até mesmo em doença hemolítica por ABO severa, as hemácias do recém-nascido podem não aglutinar com o reagente monoespecífico anti-C3d, que é utilizado para a detecção de células recobertas por essa fração do sistema complemento, indicando sua ativação. Isso ocorre basicamente por dois fatores: a fraca expressão dos antígenos A e B em hemácias de crianças recém-nascidas e o nível relativamente baixo de complemento no soro.

Na análise de dados hematológicos, a concentração de hemoglobina (Hb) no sangue de cordão pode apresentar-se abaixo dos limites normais. Já após o nascimento, em função de um aumento dos limites dos valores normais de Hb, devido a uma diminuição fisiológica, pela troca de produção da hemoglobina fetal pela hemoglobina A de adulto, é incomum encontrar uma criança definida como anêmica. Comparado com a doença hemolítica por incompatibilidade materno-fetal Rh, a doença por ABO é um incidente que encurta a vida das células, mas é incomum a anemia ser encontrada após duas semanas de vida.

Na doença hemolítica perinatal por incompatibilidade materno-fetal por ABO, um aumento moderado de reticulócitos é comum. Apenas em casos muito graves (que, por sua vez, são raros na incompatibilidade ABO) pode-se encontrar uma contagem de reticulócitos de até 15%. Nesses casos, o encontro de células da linhagem eritróide nucleadas também é bastante comum (eritroblastose fetal). Também, observam-se microesferócitos e fragilidade osmótica dessas hemácias, pelo menos em casos moderadamente graves. Considerando a doença hemolítica por Rh, até mesmo em casos graves, são achados apenas aumentos secundários na fragilidade osmótica e a esferocitose é incomum.

Em crianças com doença hemolítica por ABO relativamente severa, a quantidade de anticorpos por célula parece ser menor que 220 moléculas de anticorpo por célula em 10 de 15 casos. Dessa forma, o teste de antiglobulina direto pode estar negativo em uma criança moderadamente afetada pela doença hemolítica, já que esse teste possui a limitação de detectar hemácias recobertas por anticorpos que estejam em quantidade mínima de 100 a 150 moléculas de anticorpo/célula.

O teste de antiglobulina direto realizado pelo método em tubo possui uma sensibilidade menor que pelo método em reação em coluna. Desse modo, acentua a observação de casos de crianças com DHPN por incompatibilidade ABO que possuem esse teste negativo.

O teste de antiglobulina indireto realizado com *eluato* de hemácias de recém-natos e hemácias $A_1$/B pode apresentar forte intensidade de reação, mesmo quando o teste de antiglobulina direto (TAD) dessas crianças apresente resultados de aglutinação fracamente positivos ou até negativos. Assim, acredita-se que os achados no TAD não indicam corretamente a quantidade de anticorpos ligados nas hemácias *in vivo*. Já na técnica de eluição, ocorre uma concentração de anticorpos que permite sua detecção.

## Considerações transfusionais

Embora o aumento da concentração de bilirrubina no soro da criança seja normalmente moderado, e podendo ser controlado por fototerapia, inicialmente casos de *kernicterus* (por incompatibilidade ABO) foram descritos. Atualmente, quando o caso é muito grave, a exsangüíneo-transfusão é imediatamente realizada aliada à fototerapia, evitando assim o dano ao sistema nervoso central. Sempre que a exsangüíneo for realizada em recém-nascido com DHPN por incompatibilidade ABO, hemácias O devem ser utilizadas. Na escolha do doador, excluir aqueles com anti-A e anti-B potentes, que podem exarcebar o processo hemolítico. A melhor solução nesses casos é reconstituir uma bolsa de sangue total utilizando concentrado de plaquetas e de hemácias do grupo O e plasma do grupo AB, de preferência de indivíduos secretores.

Em alguns casos, a utilização de hemácias de adultos do grupo A ou B, em uma transfusão simples em crianças com DHPN, pode ajudar a retirada rápida dos anticorpos anti-A e/ou anti-B da circulação da criança, já que

essas hemácias possuem uma quantidade maior de sítios antigênicos A e B. Porém, dependendo da potência dos anticorpos maternos, pode ocorrer hemoglobinúria e aumento de bilirrubina indireta, podendo levar até a uma lesão do SNC.

Falterman e Richardson[8] descreveram reações hemolíticas com hemoglobinúria e hiperbilirrubinemia em três casos de crianças prematuras do grupo A ou B de mães do grupo O e que receberam hemácias ABO compatíveis com seus grupos sangüíneos. Exames pré-transfusionais mostraram teste de antiglobulina direto negativo e pós-transfusionais positivos. O anticorpo foi identificado como anti-A ou anti-B maternos, que estavam na circulação da criança, mas, devido à pequena expressão dos sítios antigênicos A ou B, estes não haviam se ligado aos eritrócitos. Reagiram, porém, com as hemácias de adulto transfundidas, que apresentam grande quantidade de sítios antigênicos.

## Doença hemolítica do recém-nascido ou perinatal por outros anticorpos além do anti-D e contra os antígenos do sistema ABO

### Etiologia

A etiologia da doença hemolítica perinatal por outros anticorpos é igual às causadas por incompatibilidade materno-fetal por anti-D. Costuma ser pouco freqüente. Porém, se a mãe é politransfundida ou em algum momento de sua vida recebeu transfusão sangüínea e se sensibilizou, existe maior probabilidade de ter produzido um anticorpo IgG que atravessa a barreira placentária, e, se o feto for antígeno-positivo, pode ser estabelecido um aumento de destruição de hemácias e conseqüentemente doença hemolítica perinatal.

---

8 C. G. Falterman & J. Richardson, "Transfusion Reaction Due to Unrecognized ABO Hemolytic Disease of the Newborn Infant", em *J. Pediat.*, nº 97, 1980, pp. 812-814.

***Podemos utilizar a RhoGan ou a imunoglobulina anti-D como medida profilática nesses casos?***

Não. A imunoglobulina anti-D só efetiva se a mãe é $Rh^-$ e o feto Rh+. Caso contrário, se a mãe é Rh+ e produz outro anticorpo contra outro antígeno Rh ou de outro sistema, a imunoglobulina anti-D não deve ser administrada: primeiro porque este anticorpo se ligaria às hemácias maternas (que são Rh+) e depois porque não bloquearia os epítopos dos antígenos fetais no qual a mãe não possui, podendo assim ocorrer a fase de reconhecimento da resposta imune e, assim, sensibilização materna.

Não existem procedimentos de administração de imunoglobulinas profiláticas para evitar a sensibilização da mãe contra outros antígenos eritrocitários. Como na maioria dos casos, estes são oriundos de sensibilização por transfusão sangüínea. Vale a pena ressaltar a importância de selecionar sangue de hemocomponente fenoticamente semelhante (pelo menos para os antígenos mais imunogênicos, como outros antígenos do sistema Rh, K (K1), Kidd e Duffy) a crianças do sexo feminino ou mulheres em idade fértil que estão recebendo transfusão pela primeira vez. Essa atitude é um meio profilático para essas doenças hemolíticas.

***Quais as freqüências e especificidades mais comuns de DHPN por outros anticorpos?***

Como a incidência é incomum, avaliações estatísticas tornam-se difíceis. Mas sabemos que, após o advento da profilaxia da DHPN por anti-D, aumentou a incidência da DHPN por outros anticorpos. As especificidades mais envolvidas, em ordem crescente, são: anti-c, anti-K, anti-E, anti-$Fy^a$ e anti-$Jk^a$. Ainda, outros anticorpos de outras especificidades menos freqüentes podem estar envolvidos, isolada ou conjuntamente.

***Qual a severidade da DHPN por outros anticorpos? Como podemos quantificá-la/predizê-la?***

Dependendo da especificidade, podem apresentar graus diferentes de severidade e manifestações clínicas. Isso sugere que o título dos anticorpos não correspondem necessariamente à evolução dos sinais e sintomas.

Isso se confirma especialmente no caso do anti-K (K1), em que vários estudos mostraram que a intensidade do anticorpo não se correlaciona diretamente com a severidade da doença, sendo indicado que, nesses casos,

seja feita a genotipagem do feto para predizer o valor clínico e para determinação de feto de risco.[9]

## Testes laboratoriais para detecção de DHPN

Após o nascimento da criança com suspeita de DHPN, deve-se colher sangue do cordão para realização dos seguintes exames:

- fenotipagem ABO/Rh;
- teste de antiglobulina direto (TAD) ou Coombs direto;
- bilirrubinas;
- hemograma.

Podem-se, ainda, realizar hematócrito, dosagem de hemoglobina e contagem de reticulócitos, que são exames complementares de grande importância na avaliação clínica.

Como citado em outros capítulos, esses testes podem ser realizados por várias metodologias. O importante é que, quando utilizamos sangue de cordão, as hemácias a ser utilizadas devem ser lavadas com solução fisiológica por no mínimo seis vezes. Esse processo visa a eliminar a interferência da grande quantidade de proteínas ali contidas (sobretudo pela presença da geléia de Wharton).

Na impossibilidade da utilização de sangue de cordão, sangue venoso do recém-nato pode ser utilizado, e, principalmente nesse caso, recomenda-se a utilização de metodologia que requeira pequena quantidade de amostra, como, por exemplo, o gel-teste centrifugação.

## Tratamento de DHPN

O tratamento da doença hemolítica perinatal por incompatibilidade materno-fetal fundamenta-se:

---

9 M. Rios & L. M. Castilho, "Biologia molecular dos grupos sangüíneos e sua aplicação em medicina transfusional". Curso de aperfeiçoamento em biologia molecular. Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo, 1998.

a) Na correção da anemia nas formas predominantemente anêmicas: transfusões intra-uterinas são indicadas nos casos graves prevenindo morte ou hidropsia fetal. Esse procedimento visa a manter volume efetivo de eritrócitos no feto, até aumentar sua chance de sobrevivência na vida extra-uterina.

b) Na detenção do aumento da bilirrubina indireta (BI-não conjugada), por meio da fototerapia nas formas ictéricas leves, em que há a exposição do recém-nascido à luz branca ou azul, que promove a fotoisomerização da bilirrubina, transformando-a em isômeros não-tóxicos. Essa transformação acontece no espaço extravascular, sendo esses fotoisômeros transportados pela albumina até o fígado, e excretados na bile sem necessidade de conjugação hepática. Uma vez no intestino, esses isômeros podem ser transformados novamente em bilirrubina não-conjugada. Os produtos da fotoxidação, além de serem eliminados nas fezes, são também eliminados na urina, em proporções bem menores.

c) Na detenção do aumento da bilirrubina indireta (BI-não conjugada), remoção dos anticorpos maternos e correção da anemia, por meio da exsangüíneo-transfusão, nos casos graves e muito graves. A decisão sobre a exsangüíneo depende da gravidade do caso e pode ser: parcial imediata, com papa de hemácias ao nascimento e posterior exsangüíneo-transfusão completa se o recém-nascido apresentar hidropsia, hepatoesplenomegalia considerável, icterícia, palidez; e exsangüíneo-transfusão total, baseada nos níveis de bilirrubina e, em menor grau, na severidade da anemia.[10]

---

10 E. Miura, *Neonatologia: princípios e prática* (Porto Alegre: Artes Médicas, 1991), pp. 131-144.

# Anemia hemolítica auto-imune (AHAI):

## aspectos laboratoriais

## Introdução

Como já vimos no capítulo 1, o sistema imune é vital, pois nos defende de agentes estranhos. Mas, se, por um lado, a imunodeficiência pode tornar o indivíduo vítima de infecções e tumores, por outro, um sistema imune hiperativo pode causar doença fatal, como no caso da reação alérgica ao veneno de abelha. Ainda, em algum momento, esse sistema pode perder a capacidade de reconhecer o que é próprio do não-próprio, produzindo imunidade contra os seus tecidos e células.

A hemólise mediada por anticorpos representa uma anormalidade adquirida e extrínseca aos glóbulos vermelhos, diferente das anormalidades genéticas. Pode ser mediada por aloanticorpos ou auto-anticorpos, ou ainda induzida por drogas. Em qualquer caso, as características principais são a diminuição da sobrevida das hemácias, com acúmulo de produtos do catabolismo da hemoglobina e o aumento da eritropoese na medula óssea, como forma de compensar as perdas.

Neste capítulo, abordaremos as anemias hemolíticas de origem auto-imune (AHAI). Além da importância clínica, as AHAI, são fatores complicantes da rotina laboratorial em imuno-hematologia, visto que os auto-anticorpos interferem nas fenotipagens, identificação de aloanticorpos e provas de compatibilidade pré-transfusionais.

Antes de entrarmos no mérito da resolução desses casos, é necessário que se conheça a fisiopatologia das AHAI, assim como a fisiologia da hemólise mediada pelo complemento. Portanto, neste capítulo falaremos também dos aspectos principais da ativação do sistema complemento.

## Aspectos imunológicos das doenças auto-imunes

### O que é a auto-imunidade?

O sistema imune adaptativo evoluiu para permitir o reconhecimento e a captura de quaisquer substâncias estranhas ao organismo e assim promover sua remoção. Não é esperada a produção de linfócitos reativos contra os próprios componentes do organismo, pois existe um mecanismo inibidor que gera tolerância imunológica. A auto-imunidade surge provavelmente do desgaste ou falha desse mecanismo supressor.

### Tolerância imunológica

No período perinatal, com a discriminação do que é próprio (*self*) ao organismo, cria-se uma não-reatividade permanente ou tolerância, de modo que, após alcançarmos a maturidade imunológica, exista uma incapacidade de reagir contra componentes próprios. Esse mecanismo pode falhar em determinado momento, por razões variadas, e promover o aparecimento de auto-anticorpos, provocando as doenças auto-imunes. Entre elas, destacamos as anemias hemolíticas auto-imunes, lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatóide, diabetes *mellitus* dependentes de insulina, tireoidite de Hashimoto etc.

A auto-imunidade é uma causa importante de doenças e estima-se que afete de 1% a 2% da população.[1] Pode resultar de vários fatores, como anormalidades primárias dos linfócitos (falha na deleção de linfócitos auto-reativos); bases genéticas que predispõem à auto-imunidade (por exemplo, o diabetes mellitus insulinodependente); o sexo (como exemplo, o LES é mais comumente encontrado em mulheres); mecanismos que levam à lesão tecidual; e as infecções microbianas, que causam uma ativação normal da resposta imune, mas

[1] A. K. Abbas *et al.*, *Imunologia celular e molecular* (3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000).

acabam por reconhecer indevidamente uma proteína própria do organismo-reação cruzada, como, por exemplo, na febre reumática.

Há uma crescente de evidência que células B e T auto-reativas estão presentes normalmente no organismo. Muitos autores sugerem que auto-anticorpos tenham função de promover a marcação de células para a morte, com uma ação fisiológica.

Mas a principal dificuldade na definição dos mecanismos auto-imunes está em estabelecer e identificar os antígenos que iniciam as respostas auto-imunes e os linfócitos que medeiam essas reações. Em suma, as etiologias específicas dessas doenças não estão bem definidas.

## Doenças causadas por anticorpos

São de dois tipos:

a) Produzidas por imunocomplexos (antígeno solúvel + anticorpo específico), que se formam na circulação e podem se depositar na parede dos vasos e em outras partes do corpo, resultando em ativação linfocitária e dos fatores do complemento, com lesão tecidual. Os anticorpos são geralmente da classe IgM e das subclasses $IgG_1$ e $IgG_3$ (pela facilidade de ativação do complemento, como veremos a seguir). Não são determinadas por antígenos específicos, mas sim pelo local da deposição desses imunocomplexos.

Portanto, doenças mediadas por anticorpos tendem a ser sistêmicas, com pouca ou nenhuma especificidade contra um antígeno em particular.

b) Produzidas por auto-anticorpos específicos contra determinado tipo de tecido e/ou célula, e não por imunocomplexos circulantes, também provocando lesão tecidual. De qualquer modo, não são claros os mecanismos que induziram à formação desses auto-anticorpos. São exemplos, as AHAI e a trombocitopenia imune. Os anticorpos causam lise mediada por complemento e opsonizam células, marcando-as para serem fagocitadas. Podem estar associadas a outras doenças auto-imunes, como LES.

Os anticorpos antieritrocitários desempenham papel na destruição das hemácias, causando anemia hemolítica de origem auto-imune. Anticorpos antiplaquetas são geralmente responsáveis pela púrpura trombocitopênica idiopática, que causa diminuição na contagem global de plaquetas.

## Anemia hemolítica auto-imune (AHAI): a destruição dos eritrócitos

Trata-se de sobrevida eritrocitária encurtada, devido à presença de autoanticorpos produzidos pelo próprio organismo.

A diferenciação entre AHAI e outras anemias hemolíticas (por exemplo, hemoglobinopatias, enzimopatias etc.) consiste em demonstrar a presença de anticorpos antieritrocitários.

O teste laboratorial da antiglobulina humana direta (TAD) é o mais utilizado para esse fim.

A intensidade e/ou importância da hemólise depende do tipo de anticorpo envolvido (classe e subclasse) e de sua conseqüente capacidade de fixar complemento.

### Mecanismos de destruição dos glóbulos vermelhos

Geralmente, aloanticorpos ou autoanticorpos atuam pelos mesmos mecanismos para destruição das células-alvo:

*Intravascular*

Ag×Ac + complemento (C1 a C9): hemoglobina livre.

O importante é determinar se os anticorpos são fixadores ou não de complemento. Isso depende essencialmente da classe e subclasse IgG (especialmente IgM e $IgG_3$ e $IgG_1$). Além disso, depende do número e proximidade dos sítios antigênicos.

As características laboratoriais mais importantes são hemoglobinemia, hemoglobinúria, aumento da metemoglobina, diminuição da haptoglobina, icterícia e hemossiderinúria. Explicando: com a destruição das hemácias, a hemoglobina livre no plasma liga-se à alfa2 globulina (haptoglobina). A diminuição nos níveis de haptoglobina deve-se à fagocitose do complexo pelas células do sistema monocítico fagocitário (SMF). Com isso, a hemoglobina livre é oxidada; a metemoglobina, excretada pelos rins, provocando o aparecimento da hemoglobinúria. A hemossiderose no epitélio tubular renal resulta da deposição da hemoglobina filtrada. A icterícia surge dos altos níveis de bilirrubina não-conjugada ou bilirrubina indireta.

Nas AH, a bilirrubina sérica aparece na forma não-conjugada, provocando a hiperbilirrubinemia.

*Extravascular*

Fagócitos SMF (baço e fígado): hiperbilirrubinemia.

Neste mecanismo, a fagocitose ocorre:

a) por opsonização das células-alvo por anticorpos IgG, sem ativação de complemento;

b) IgG com ativação da cascata do complemento somente até C3b;

c) somente por ligação de frações do complemento às células-alvo.

- A ligação dos anticorpos e frações de complemento funciona como sinalização para macrófagos do sistema monocítico fagocitário (SMF), que possuem receptores para frações Fc, em torno de $1 \times 10^6$ por macrófago (Arend e Mannik). Haverá, então, perda de flexibilidade da membrana, provocando a esferocitose. Esses glóbulos serão assim capturados na microcirculação, preferencialmente esplênica, provocando esplenomegalia.
- SMF pode remover até 400 mℓ de glóbulos por dia ligados a IgG.[2]
- O baço é até cem vezes mais eficiente que o fígado nessa remoção. Ex.: comprovou-se em experiência, reunindo glóbulos vermelhos Rh(D) positivos e certa quantidade de anti-Rh(D), observando os seguintes resultados:

  - 20 minutos: *clearance* pelo baço;

  - 5 h: *clearance* pelo fígado em esplenectomizados.

Por isso, para alguns indivíduos com AHAI quente, a esplenectomia é indicada para diminuição do seqüestro de células opsonizadas e a corticoterapia, para diminuição da produção de auto-anticorpos.

- Características laboratoriais: do catabolismo das hemácias pelas células fagocitárias resultam anemia e icterícia. A Hb liberada

[2] P. L. Mollison *et al.*, *Blood Transfusion in Clinical Medicine* (10ª ed. Londres: Blackwell Science, 1997).

pelas células fagocitárias liga-se à haptoglobina, diminuindo seus níveis séricos.

## Sistema complemento e a destruição intravascular

O sistema complemento consiste de uma série de 25 proteínas, sendo nove delas principais ou centrais, que estão no plasma sangüíneo e complementam a ação dos anticorpos.

### *Representações gráficas*

- Proteínas do complemento: C1 (C1qrs), C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9.
- Fragmentos após clivagem: designamos por letras *a* e *b*, por exemplo, C3a, C5b.
- Componentes ativados: colocar barra horizontal sobre o componente, por exemplo, $\overline{C4b2a3b}$ (C5 convertase).

### *Ativação do complemento*

Haverá uma interação de proteínas (*componentes*), que serão seqüencialmente ativadas por fragmentação enzimática, e promoverão a clivagem do componente central C3.

As proteínas do *C* estão normalmente presentes na circulação, inativadas ou em baixa ativação.

Portanto, quando dizemos que o *complemento foi ativado*, devemos entender que, a partir de sua ativação, ocorrerão reações enzimáticas de clivagem, com funções biológicas importantes.

### *Funções biológicas do C* (Figura 1)

- Citólise: frações do complemento polimerizam-se na superfície celular, formando poros, que alteram a integridade da membrana, provocando *lise osmótica*.
- Opsonização: frações do complemento ligam-se à superfície de células e/ou partículas estranhas, em um processo conhecido como opsonização. Os fagócitos do SMF ligam-se por receptores e promovem a *fagocitose*.

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PAPEL BIOLÓGICO DO COMPLEMENTO.

- Ativação da inflamação: fragmentos do complemento, denominados anafilotoxinas (C3a e C5a), promovem ativação de mastócitos, que liberam histamina, provocando reação semelhante à hipersensibilidade imediata. Outros alvos desses fragmentos peptídicos incluem endotélio vascular, músculos lisos e leucócitos inflamatórios.
- Solubilização dos complexos imunes: diminui a sua formação e/ou desestabiliza os já existentes.

### *Mecanismos de ativação*

Via clássica, com a ligação do anticorpo ao antígeno específico (Ag-Ac), e via alternativa, por agentes extrínsecos. (Figura 2)

a) Via clássica

- Fixação do componente C1 pelas imunoglobulinas ligadas aos antígenos específicos. C1q liga-se ao domínio CH2 das Ig. Esse fragmento possui seis sítios de ligação com a Ig e pelo menos dois devem estar ligados para haver a devida estabilização. (Figura 3)
- Portanto, para ativação do *C*, deve haver pelo menos duas moléculas de IgG ligadas a seus antígenos, e próximas, para que possa haver compartilhamento dos domínios CH2 (Figura 4). As subclasses IgG que têm maior capacidade de ativação são, respectivamente, IgG3 > 1 > 2. IgG4 não fixa complemento; ou uma molécula de IgM, já que os domínios CH2 estão adjacentes. A

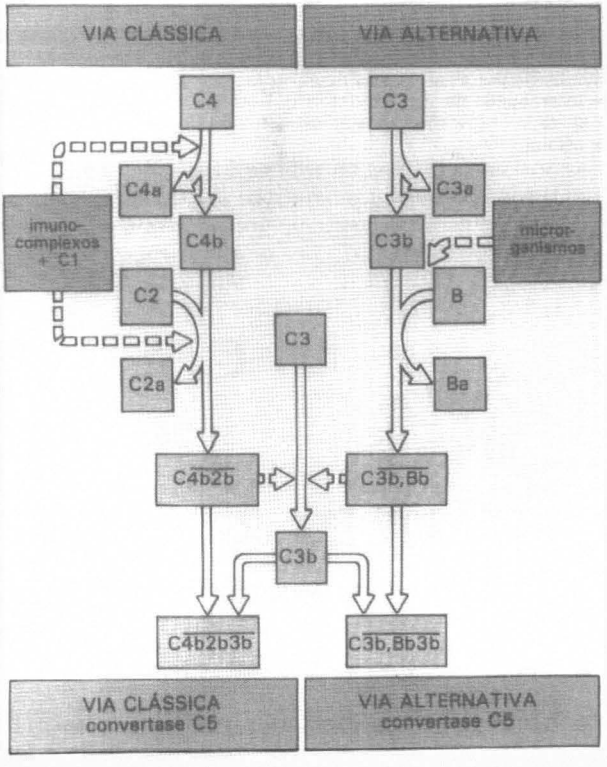



FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CASCATA DO COMPLEMENTO.

IgM, quando combinada com o antígeno, assume forma espacial adequada à fixação do *C*.

b) Via alternativa

- Ativada em ausência de anticorpos, por polissacarídeos (Zimosan, inulina), endotoxinas bacterianas (Gram-), veneno de cobra.
- Atuam sobre fator B (pró-ativador C3), sem intervenção de C1, C2, C4. Gera tanto formas solúveis de C3 convertase, como ligadas à membrana.
- Forma C3 convertase na superfície bacteriana: forma primitiva de defesa - cobertura da célula por *C*, levando à fagocitose. Se C3b deposita-se em células autólogas, ocorre rápida inativação para não se provocar danos.

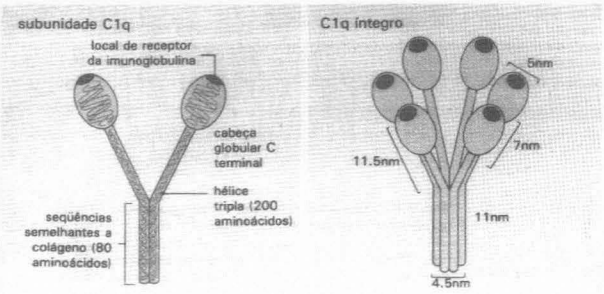



FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FRAÇÃO C1 DO COMPLEMENTO.

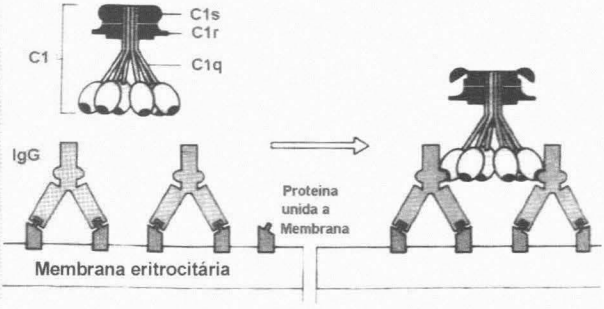



FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO DA FRAÇÃO C1 DO COMPLEMENTO, POR ANTICORPOS DE CLASSE IGG FIXADOS À MEMBRANA ERITROCITÁRIA.

### *A cascata do complemento*

Alguns aspectos da cascata do complemento são fundamentais para compreendermos algumas situações da rotina laboratorial.

Como já dissemos, a ativação da via clássica se dá pela reação antígeno e anticorpo com capacidade de fixar complemento. Portanto, essa forma de ativação é a mais importante para a imuno-hematologia. (Figuras 5, 6, 7 e 8)

### *Conseqüências da ativação*

- Hemólise intravascular, se a cascata for ativada de C1 até C9: forma-se no final o complexo de ataque à membrana (CAM), constituindo poros que alteram a permeabilidade, provocando lise osmótica. Ex.: aloanticorpos Kidd; transfusões ABO incompatíveis.
- Hemólise *in vitro*: pode ocorrer lise osmótica da hemácia somente nas condições do teste, especialmente se houver ligação Ag-Ac na temperatura ambiente (por anticorpos frios sem significado clínico) e isso não representar que este esteja ocorrendo *in vivo*.

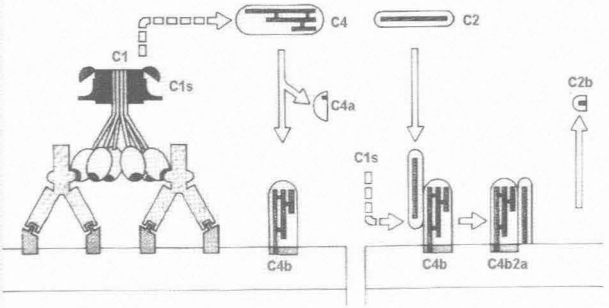



FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO DAS FRAÇÕES C4 E C2 DO COMPLEMENTO.

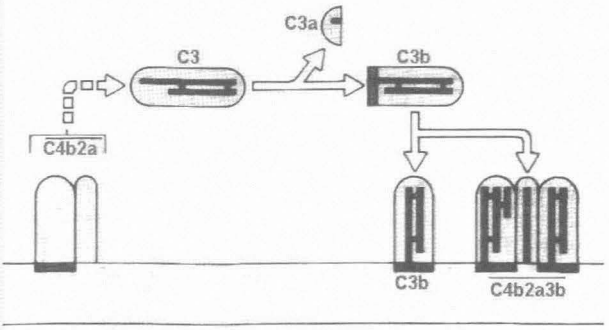



FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO DA FRAÇÃO C3 DO COMPLEMENTO, COM A FORMAÇÃO DO COMPLEXO DENOMINADO C5 CONVERTASE.

- Hemólise extravascular:
  - opsonização de hemácias por IgG com fixação C, ocorrendo ligação aos receptores Fc (das Ig) pelos macrófagos;
  - fagocitose de hemácias opsonizadas somente por C.

Em ambos os casos, isso ocorrerá somente se a cascata for inibida no momento da fragmentação do C3, que sofre a ação das proteínas reguladoras. (Figura 9)

Lembrar que nem sempre a ativação da cascata do complemento culmina com a formação do CAM, e conseqüentemente com lise intravascular. A ativação apenas até C3 provocará destruição extravascular.

### *Mecanismos reguladores*

A regulação é necessária para prevenir a destruição das próprias células pelo C:

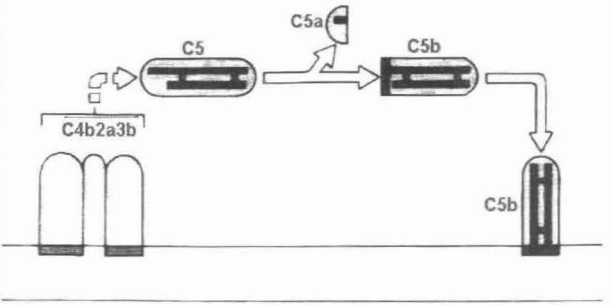



FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO DA FRAÇÃO C5 DO COMPLEMENTO.

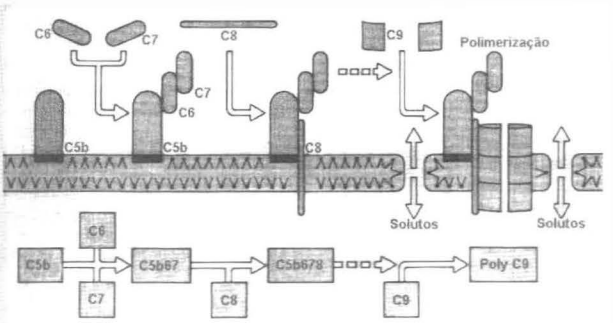



FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVAÇÃO DAS FRAÇÕES C6, 7, 8 E 9 DO COMPLEMENTO, FORMANDO O CHAMADO COMPLEXO DE ATAQUE À MEMBRANA (CAM).

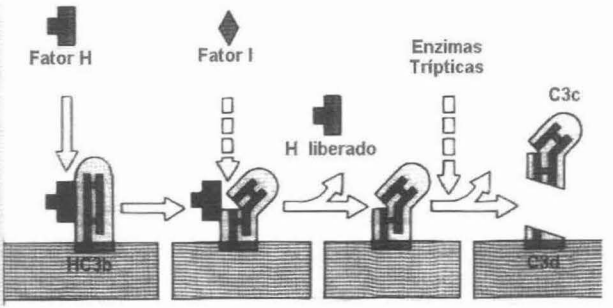



FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INIBIÇÃO DA CASCATA DO COMPLEMENTO POR FRAGMENTAÇÃO DO COMPONENTE C3b PELOS FATORES H E I, FORMANDO OS FRAGMENTOS C3c E C3d.

- proteínas reguladoras presentes na membrana celular e/ou fase fluida interagem com frações C;
- a extrema labilidade desses componentes a temperaturas elevadas também regulam a atividade da cascata;
- necessidade de formação de complexos Ag-Ac para sua ativação é fator limitante.

*Anticorpos geralmente fixadores de complemento*

- Anti-A, -B, -Vel, -$Jk^a$, -$Le^a$: causam hemólise *in vivo* e *in vitro*.
- Anti-$Le^a$, -$Le^b$, -$P_1$: podem recobrir hemácias com complemento, sem lisá-las.
- Anti-K, -$Fy^a$, -$Fy^b$, -S, -s, -I, -i, -HI: fixam complemento, mas não provocam hemólise.

***Então, como as hemácias acabam sendo revestidas pelas frações de complemento?***

Por dois mecanismos:

- pela ativação da cascata, por meio da ligação de anticorpos fixadores de complemento e antígenos de superfície dos eritrócitos; os fragmentos resultantes da cascata ligam-se, portanto, à membrana;
- imunocomplexos do plasma ativam a cascata do complemento, e fragmentos desta adsorvem-se inespecificamente às hemácias. Estas acabam por fazer o papel de simples espectadoras.

Em ambos os casos, as hemácias estão revestidas de frações de complemento, que levarão ou não à hemólise, mas que poderão ser detectadas pelos soros de AGH poliespecíficos.

Portanto, os componentes de complemento podem ser identificados pelos reagentes AGH, mas não significar hemólise *in vivo*.

***O que representa a presença do complemento nos testes imuno-hematológicos?***

- Teste da antiglobulina direta (TAD ou Coombs direto) positivo por complemento: o componente C3d (fragmento inativo) pode estar fixado à hemácia, por aloanticorpos e/ou auto-anticorpos. Em 10% a 20% dos pacientes com AHAI, o TAD pode estar positivo somente por causa de frações de complemento, especialmente em caso de baixas quantidades de anticorpos IgG, abaixo do limiar de sensibilidade do teste (já comentamos no capítulo 3).
- O complemento pode estar revestindo as hemácias lavadas, sem a presença da Ig. Ex.: IgM dissociada durante lavagem.
- Na síndrome das crioaglutininas: os anticorpos ligam-se às hemácias na circulação superficial (baixa temperatura), fixam complemento e

dissociam-se a 37 °C, podendo ser detectados pelos soros AGH poliespecíficos.

- Complexos imunes solúveis (CI) + complemento = ligação fraca na hemácia → dissociação do CI. Ex.: Acs droga-induzidos.
- Casos de septicemia por microorganismos geralmente Gram- ou infecções localizadas podem causar ativação da cascata por via alternativa e promover a ligação de frações peptídicas do complemento às hemácias.

Como já dissemos no capítulo 3:

- TAD: para detecção de hemácias recobertas por complemento, o teste deve ser incubado por cinco minutos antes da centrifugação, utilizando-se soro AGH poliespecífico.
- Componentes do complemento ligam-se à hemácia de coágulo → realizar TAD com amostra colhida com anticoagulante (EDTA, ACD, CPD).

## Aspectos fisiopatológicos das AHAI

| Classificação e incidência | |
|---|---|
| AHAI quente | 48%-70% |
| AHAI frio (crioaglutinina) | 16%-32% |
| Mista | 7% |
| Induzida por drogas | 12%-18% |
| Hemoglobinúria paroxística a frio (PCH) | raro em adultos; 32% em crianças |

Fonte: American Association of Blood Banks, *Technical Manual* (Bethesda: AABB, 2000).

| AHAI quente | AHAI frio |
|---|---|
| Causa: anticorpos IgG, reativos a 37 °C<br>a) Idiopática<br>b) Secundária:<br>• lúpus eritematoso sistêmico<br>• leucemia linfocítica crônica<br>• linfoma maligno<br>• colite ulcerativa<br>• teratoma ovariano<br>• medicamentos | Causa: anticorpos geralmente IgM*, reativos entre 4 °C e 22 °C.<br>a) Idiopática<br>b) Secundária:<br>• pneumonia por mycoplasma<br>• mononucleose infecciosa<br>• linfoma maligno<br>• hemoglobinúria paroxística a frio (* anticorpos IgG bifásicos+ C) |

Fonte: American Association of Blood Banks, *op. cit.*

## AHAI A FRIO

*Síndrome da crioaglutinina* (CAIHA)

- Causada por anticorpos IgM, que se ligam avidamente a eritrócitos em baixas temperaturas, por isso são chamados de crioaglutininas. Ocorrem geralmente de forma aguda, durante recuperação de doenças infecciosas, como pneumonia por micoplasma e mononucleose infecciosa.
- Características:
  - 16% do total de casos de AHAI, e geralmente benignos;
  - anticorpos IgM que reagem melhor a 4 °C;
  - patológicos somente se em alto título ou em grande amplitude térmica;
  - especificidade do anticorpo: anti-I (-i, -P, -HI).
- Mecanismo:
  - Anticorpo se liga ao glóbulo vermelho (GV) na circulação periférica (32 °C) à ativa Complemento → retorna à circulação interna, deixando somente o C3 na membrana → fatores inibidores de C3 → C3b → C3c → C3d → interrompe a cascata → hemólise extravascular.
- Tipos:
  a) Crônica, sendo mais comum em adultos com mais de 50 anos:
     - hemólise branda;
     - hemoglobinúria;
     - síndrome Raynauld (cianose de extremidades quando da exposição ao frio).
  b) Aguda, apresentando-se em todas as idades:
     - infecção viral recente (micoplasma = anti-I e mononucleose = anti-i);
     - síndrome mieloproliferativa.
- Aspectos laboratoriais e procedimentos geralmente empregados:
  - geralmente TAD positivo por *complemento*;
  - reticulocitose;

- usar soro AGH monoespecífico IgG;
- utilizar plasma, e não soro;
- realizar técnicas de preaquecimento;
- auto-adsorção a frio;
- reagentes Thiol;
- evitar potencializadores de reação (PEG, LISS).

• Aspectos clínicos e procedimentos geralmente empregados:
  - geralmente não necessitam de transfusão;
  - evitar exposição ao frio;
  - casos severos: plasmaférese;
  - corticoterapia e esplenectomia ineficazes.

*Hemoglobinúria paroxística a frio (HPF)*

• Características:
  - 1% a 2% adultos;
  - 32% crianças com histórico de infecção viral de vias aéreas superiores;
  - especificidade do anticorpo: IgG contra ag P (antígeno de alta freqüência, diferente de P1), também denominado anticorpo Donath-Landsteiner (hemolisina bifásica).

• Aspectos laboratoriais e procedimentos geralmente empregados:
  - TAD positivo por C3;
  - diferenciar HPF de hemoglobinúria paroxística noturna (defeito de membrana do glóbulo vermelho);
  - dosagem de hemoglobina entre 4 g e 5 g/dℓ.

• Aspectos clínicos e procedimentos geralmente empregados:
  - hemoglobinúria;
  - febre;
  - icterícia;
  - palidez;
  - cólicas abdominais e dores nas costas;
  - evitar frio;

- recomendação eventual de transfusão;
- associada a Micoplasma, sarampo, caxumba, gripes;
- corticoterapia indicada.

## AHAI A QUENTE

### *AHAI quente induzida por drogas*

Mecanismos:

1. Mecanismo não-imune - O mais comum. A droga ou o produto de sua biotransformação interferem no metabolismo essencial de sobrevivência da célula causando sua morte prematura, sem o envolvimento de anticorpos.
   a) Principais drogas envolvidas:
      - cefalosporinas (2ª e 3ª gerações);
      - outras cefalosporinas;
      - penicilina e derivados;
      - diglicoaldeido;
      - suramin;
      - cisplatin.
   b) Adsorção protéica não-imunológica:
      - mecanismo independente de anticorpos;
      - ocorrência rara;
      - TAD geralmente negativo. Quando positivo, poderemos identificar a presença de frações de complemento, por adsorção de proteínas aos eritrócitos (albumina, IgA, IgG, IgM, alfa e beta globulinas), de modo não-imunológico;
      - aspectos clínicos: novas gerações cefalosporinas podem estar associadas a hemólises severas. Cefalosporinas podem também agir sob mecanismo de adsorção de drogas aos glóbulos vermelhos. Pode estar associada com deficiência de G6PD.
2. Mecanismo imune - Pouco freqüente. A droga ou seu metabolismo induz, por diferentes mecanismos, à produção de anticorpos que causam a destruição *in vivo* de eritrócitos. Várias drogas podem induzir

à produção de anticorpos auto-reativos, porém nem todos esses anticorpos são considerados auto-imunes.

Devemos diferenciar anticorpos promotores da anemia hemolítica droga-induzida daqueles anticorpos produzidos contra auto-antígenos devido à perda de autotolerância e causadores das anemias hemolíticas auto-imunes crônicas.

Embora a hemólise promovida por anticorpos droga-induzidos e por anticorpos da AHAI possam ser semelhantes laboratorialmente, a conduta clínica e a terapêutica para a solução da hemólise serão diferentes. Na anemia hemolítica droga-induzida, o problema se resolve com a retirada da droga indutora (na maioria dos casos).

Características:

- Drogas normalmente possuem peso molecular inferior a 5-Kda, por isso são denominadas haptenos. Ligam-se a proteínas carreadoras para ser imunogênicas.
- Auto-anticorpos droga-induzidos mostram extrema especificidade contra partes celulares comuns de glóbulos vermelhos ou plaquetas.
- Anticorpos dependem da presença da droga (medicamentos e/ou produtos químicos) para ser visualizados e/ou produzir destruição dos glóbulos vermelhos.

Novas teorias sugerem que as drogas promovem aparecimento de anticorpos baseado na capacidade de interagir com componentes celulares específicos, alterando-os e fazendo com que não sejam reconhecidos como próprios: portanto, um neo-antígeno é produzido. O anticorpo será, então, formado contra essa estrutura "nova" e não contra o hapteno.[3]

Descreveremos abaixo os seguintes mecanismos:

- adsorção das drogas;
- formação de complexo imune;
- alteração do sistema imune.

a) Adsorção das drogas. Ex.: penicilina.
   - Principais drogas envolvidas:
     - penicilina G e derivados;

[3] A. K. Abbas *et al.*, *op. cit.*

- cefalosporinas (1ª e 2ª gerações);
- outras cefalosporinas.

- Anticorpos droga-dependentes.
- Anticorpos são dirigidos contra a droga → droga liga-se fortemente à membrana do glóbulo vermelho.
- TAD fortemente positivo (IgG).
- Eventual presença de complemento.
- PAI geralmente negativa.
- Anticorpo do eluato reage com glóbulos vermelhos recobertos pela droga, e não com normais (painel negativo).
- Aspectos clínicos: a hemólise ocorre somente quando grandes quantidades de droga são administradas. Aparecimento gradual, podendo ser fatal sem suspensão do medicamento. Com a suspensão da droga: aumento da sobrevida das hemácias e hemólise leve e persistente.

b) Formação de complexo imune. Ex.: quinidina, fenacetina.

- Principais drogas envolvidas:
  - quinina e quinidina;
  - fenacetina;
  - stibofen;
  - ácido paraminossalicílico;
  - algumas sulfamidas;
  - cefalosporinas (2ª e 3ª gerações);
  - penicilina e derivados;
  - diclofenac;
  - hidroclortiazina;
  - rifampicina;
  - nitrofurantoína;
  - dexacloro-feniramina;
  - clorpromazina.
- Menos freqüente.

- Uma vez formado o anticorpo, pequenas quantidades de droga produzem hemólise grave.
- Eritrócitos podem estar revestidos apenas de complemento (utilizar soro de antiglobulina humana poliespecífico).
- Anticorpo IgG ou IgM. Geralmente não são detectados na PAI, pois esses anticorpos estão ligados à droga e a proteínas. Geralmente não são identificados após métodos de eluição, pois foram dissociados durante o procedimento de lavagem das hemácias. Por essa mesma razão, para realização do TAD recomenda-se o método de gel-teste centrifugação, que dispensa o procedimento de lavagem.
- Aspectos clínicos: hemólise severa, hemoglobinúria, hemoglobinemia, insuficiência renal em 50% dos casos. Podem ocorrer trombocitopenia e leucopenia, choque, CIVD.

c) Alteração do sistema imune. Ex.: alfa-metildopa.

- Principais drogas envolvidas:
  - alfa-metildopa;
  - L-dopa;
  - procainamida;
  - ácido mefenâmico;
  - alfa-interferon;
  - gama-interferon;
  - IL-2.
- Anticorpos droga-independentes. As drogas modificam o sistema imune, induzindo à formação de auto-anticorpos verdadeiros, especialmente contra antígenos do sistema Rh (freqüentemente antígeno e).
- Auto-anticorpo classe IgG.
- Aspectos clínicos: a hemólise ocorre quando grandes quantidades de droga são administradas; 15% a 20% dos pacientes apresentam TAD+ após 3-6 meses/dose-dependente, apenas 0,5% a 1% apresenta anemia hemolítica; suspensão da droga resulta em resolução do processo imune.

Conclusões importantes

- Diante da positividade do teste de antiglobulina direto (TAD), o laboratório deverá investigar o envolvimento de drogas. Apesar de, muitas vezes, não podermos distinguir os mecanismos de droga-indução envolvidos, devemos questionar se a droga suspeita poderá ser a responsável pela positividade do teste.
- Se a suspeita for procedente, ela deverá ser retirada, antes que o anticorpo atinja um nível suficientemente alto para produzir hemólise. Usualmente, a retirada da droga envolvida na indução reverte a produção de anticorpos.
- É possível que uma droga atue por mais de um mecanismo.

*AHAI a quente*

- É a forma mais comum das AHAI.
- Em 50% dos casos é idiopática e em 50%, secundária a outras doenças.
- Anticorpos são geralmente IgG, e às vezes IgA.
- Na maioria das vezes o mecanismo de destruição dos GV não é intravascular, portanto os GV recobertos por anticorpos se ligam aos receptores Fc dos fagócitos esplênicos e sofrem transformação em esferócitos; fagocitose especialmente pelo baço, com conseqüente esplenomegalia.
- Alguns dos anticorpos demonstram possuir certa especificidade contra antígenos do sistema Rh.

## Rotina laboratorial para investigação de AHAI

### Imuno-hematologia

a) Teste de antiglobulina direto: positivo com soro AGH poliespecífico → repetir utilizando soros monoespecíficos IgG e *C*.

b) Pesquisa e identificação de anticorpos no soro e/ou plasma e eluato:
   - identificar anticorpos clinicamente significativos contra antígenos eritrocitários no soro e/ou plasma.
   - identificar anticorpos no eluato. Lembre-se: somente complemento ligado às hemácias → eluato negativo.

O resultado do TAD, isoladamente, não possui valor preditivo.[4]

- Avaliar outros parâmetros de diagnóstico laboratorial: hematócrito (Ht), dosagem de hemoglobina (Hb), haptoglobina, reticulócitos.
- História clínica: gestação, hemólise inexplicada, medicamentos administrados recentemente, transfusões.

### Hematologia

- Hematócrito.
- Hemoglobina.
- Plaquetas (geralmente normais).
- ↓ Níveis de haptoglobina.
- ↑ Atividade de HDL.
- ↑ Urobilinogênio.

### Citometria de fluxo

- Detecção do auto-anticorpo e outros aloanticorpos associados.
- Determinação da subclasse IgG.

## Considerações sobre o teste de antiglobulina direto (TAD)

1. Amostras: colher com anticoagulante, pois componentes do complemento se ligam à hemácia de coágulo → realizar TAD com amostra colhida com anticoagulante (EDTA, ACD, CPD).
2. Indicado para realizar teste em duplicata:
   - soro AGH poliespecífico (leitura após 5′ de incubação em temperatura ambiente)
   - se positivo, usar soros monoespecíficos:
     - anti-IgG (leitura imediata);
     - anti-complemento (segundo bula).

[4] American Association of Blood Banks, *Technical Manual*, cit.

## Significado do TAD positivo

- Limitações do teste:

  Sensibilidade do TAD em tubo é estimada em:

  - 200-500 moléculas de IgG/GV
  - 400-1.100 moléculas de C3d/GV

- Indivíduos saudáveis possuem certa quantidade fisiológica de auto-anticorpos IgG (5-90 mol/GV) e complemento (5-97 mol/GV), sendo eventualmente detectados em testes mais sensíveis, como gel-teste centrifugação, sem significado clínico.
- Mas, em alguns casos de AHAI clinicamente significativos, pode haver número de moléculas IgG inferior à sensibilidade do teste.
- Então, que metodologia eleger para testes de rotina? *Tubo* ou *gel-teste*?

  Considerando que existem muitos trabalhos e estudos que mostram a visível diferença de sensibilidade entre os métodos, já abordados no capítulo 3, "Teste de antiglobulina humana", sugerimos avaliar a necessidade e o tipo de paciente que seu serviço atende.

  É importante uma avaliação diagnóstica ampla ou o que efetivamente interessa é a resolução dos problemas de ordem transfusional? Para cada um dos casos, poderíamos pensar em uma resposta diversa. Assim como existem controvérsias em relação à conduta transfusional, pensamos ser mais adequado que o médico responsável e a equipe do laboratório decidam qual protocolo clínico e diagnóstico seguir.
- Relato de caso em que hemólise grave persiste, apesar da negativação do TAD:
  - indicação de testes mais sensíveis, com amostras recentes;
  - resultado do TAD deve ser dissociado da importância/evolução clínica.[5]
- Falsos negativos e positivos no TAD:
  - 2% a 4% e 8% dos casos, respectivamente.[6]

---

[5] E. Biagi *et al.*, "A Persistent Severe Autoimmune Hemolytic Anemia Despite Apparent Direct Antiglobulin Test Negativization", em *Haematologica*, 84 (11), novembro de 1999, pp. 1.043-1.045.

[6] B. Agarwal, "Autoimmune Hemolytic Anemia", em *Indian J. Pediatr.*, 65 (5), 1998, pp. 663-668.

TAD pré-transfusional: não há riscos em eliminá-lo da rotina.[7]

- TAD em AHAI quente:
  - 24% a 63% são IgG e complemento positivo;
  - 20% a 66% somente IgG;
  - 7% a 14% somente complemento C3;
  - raros IgA ou IgM associados;
  - eluato: anticorpo IgG reativo com todas as células. Ocasionalmente especificidade contra antígenos do sistema Rh.
- TAD em AHAI frio:
  - TAD positivo com AGH poliespecífico;
  - TAD negativo com AGH anti-IgG;
  - C3 quase sempre presente;
  - especificidades mais comuns dos anticorpos: anti-I, -i;
  - usualmente associado com mononucleose;
  - eluato: não reativo com hemácias para identificação de anticorpos.

## AHAI e os testes pré-transfusionais

- Aproximadamente 60% dos casos de AHAI quente apresentam auto-anticorpos no soro que reagem com todas as hemácias quando utilizamos potencializadores como gel, PEG, albumina, enzimas, cartões de gel-teste: portanto, evitar a adição desses reagentes na realização dos testes de pesquisa, identificação de anticorpos e provas de compatibilidade.
- 40% apresentam aloanticorpos associados. Portanto, é de fundamental importância determinarmos se existem aloanticorpos associados aos auto-anticorpos, visto que:
  - pacientes transfundidos com glóbulos vermelhos incompatíveis apenas com o auto-anticorpo raramente desenvolvem sinais e/ou sintomas de reação hemolítica pós-transfusional;

[7] American Association of Blood Banks, *op. cit.*

- esses eritrócitos transfundidos podem ou não ter sobrevida maior que os próprios eritrócitos do paciente;
- quando a transfusão é incompatível aos aloanticorpos associados, os eritrócitos transfundidos apresentarão sobrevida muitas vezes menor que os eritrócitos do paciente, com sinais e/ou sintomas de reação hemolítica pós-transfusional.[8]

Por isso, é de suma importância detectar aloanticorpos mascarados pelos auto-anticorpos.

- Métodos indicados na pesquisa dos aloanticorpos associados aos autoanticorpos:
  - auto-adsorção quente após dissociação do auto-anticorpo com difosfato de cloroquina/ZZAP/eluição quente;
  - adsorção com eritrócitos alogênicos tratados por enzimas ou ZZAP;
  - adsorção com PEG (soro paciente + eritrócitos alogênicos + PEG);
  - diluição do soro do paciente, apenas se o auto-anticorpo estiver em título menor que o suposto auto-anticorpo.

Em geral, determinar se a especificidade do auto-anticorpo é pouco significativo. O importante é conhecer sua capacidade hemolítica e a associação com aloanticorpos.

Caso não haja tempo para realizar pesquisa dos aloanticorpos, recomenda-se fenotipagem do paciente e bolsa para antígenos do sistema Rh (D, C, E, e, C, c), K1, $Jk^a$.[9]

- Se o auto-anticorpo demonstrar alguma especificidade definida, e caso exista sangue compatível, então recomenda-se preparar sangue negativo para o respectivo antígeno. Talvez a sobrevida desses GV seja maior.[10]

  Vale lembrar: muitas vezes essa conduta pode levar a uma aloimunização, como, por exemplo, no caso de o paciente apresentar auto-

---

[8] G. Garratty, *Compatibility Testing Patients with Autoimmune Hemolytic Anemia Associated with Warm Autoantibodies*, www. cbbsweb.org/cbgarrattyaika.html.

[9] *Ibidem.*

[10] *Ibidem.*

anticorpo de especificidade anti-e e fenótipo eritrocitário E-e+, e receber transfusão E+e-.

- Segundo Issit e colaboradores,[11] em muitos casos, os aloanticorpos detectados após auto-adsorções são na verdade auto-anticorpos mimetizando aloanticorpos:
  - 69% após auto-adsorção;
  - 19% após aloadsorção.[12]

Apesar de ser importante a resolução desses problemas, atrasar a transfusão pode levar o paciente a risco de vida. Recomendamos a ação conjunta com o médico hemoterapeuta e/ou médico responsável pelo paciente.

## Procedimentos geralmente empregados para transfusões em pacientes com AHAI

- Transfusão apenas para pacientes sintomáticos.
- Transfusão de pequenos volumes, a fim de diminuir sintomas.
- Excluir presença de aloanticorpos (clinicamente significativos) associados aos auto-anticorpos, e lembrar-se sempre de evitar novas aloimunizações.
- Se possível, determinar especificidade do anticorpo quente.
- Não expor o paciente a riscos, pela espera dos resultados dos testes adicionais.

---

11 P. D. Issit & D. J. Anstu, *Applied Blood Group Serology* (4ª ed. Durham: Montgomery Scientific, 1999).

12 *Ibidem*.

# Referências bibliográficas


ABBAS, A. K. *et al. Imunologia celular e molecular.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

ABO BLOOD GROUP SYSTEM. http://www.bh.rmit.edu.au/mls/subjects/abo/resources/directory.htm

AGARWAL, B. "Autoimmune Hemolytic Anemia", em *Indian J. Pediatr.*, 65 (5), 1998.

AL-JAWAD, S. T. *et al.* "Incidence of ABO Haemolytic Disease in a Mixed Arab Population", em *Saudi Med. J.*, 7 (1), 1986.

ALVAREZ, A. *et al.* "Relative Sensitivity of Direct Antiglobulin Test, Antibody's Elution and Flow Citometry in the Serologic Diagnosis of Immune Hemolytic Transfusion Reactions", em *Haematologica*, 85 (2), fevereiro de 2000.

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. *Technical Manual.* 12ª ed. Bethesda: AABB, 1996; 13ª ed. Bethesda, Maryland: AABB, 1999 e 2000.

ARAVECHIA, M. G. "Nomenclatura ISBT". Curso de aperfeiçoamento em imuno-hematologia eritrocitária. Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo, 2000.

BERNARD, J. *et al. Hematologia.* 9ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1998.

BIAGI, E. *et al.* "A Persistent Severe Autoimmune Hemolytic Anemia Despite Apparent Direct Antiglobulin Test Negativization", em *Haematologica,* 84 (11), novembro de 1999.

BIFANO, E. M. *et al. Clínicas de perinatologia.* Rio de Janeiro: Interlivros, 1995.

BROMILOW, I. *Gel Test and HDN Investigations*. Liverpool: Meesey Reg. Transfusion Center.

BROWN, T. A. *Genética, um enfoque molecular*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

BRYANT, N. J. *An Introduction to Immunohematology*. 3ª ed. Filadélfia: W. B. Saunders Company, 1986.

BURNIE, D. *Concise Encyclopedia Human Body*. Londres: Dorling Kindersley, 1998.

CASTILHO, L. M. "Bases e avanços do sistema Rh". I Jornada em Hemoterapia. SENAC São Paulo, 1999.

_____. "Aspectos da biologia molecular aplicados à imuno-hematologia". Curso de aperfeiçoamento em biologia molecular. Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo, 2001.

CONTRAN, R. S. *et al. Patologia estrutural e funcional*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DANIELS, G. *Human Blood Groups*. Londres: Blackwell Science, 1995.

_____. *Blood Group Terminology*, http://www.iccbba.com/wpantigentables.htm, revisado em setembro de 2000.

_____ *et al.* "ISBT Working Party Oslo Report", em *Vox Sanguinis*, 77 (1), 1999.

ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE Joaquim Venâncio (org.). *Textos de apoio em hemoterapia*, vol. 1. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2000.

FALTERMAN, C. G. & RICHARDSON, J. "Transfusion Reaction Due to Unrecognized ABO Hemolytic Disease of the Newborn Infant", em *J. Pediatr.*, nº 97, 1980.

GARRATTY, G. Compatibility Testing for Patients with Autoimmune Hemolytic Anemia Associated with Warm Autoantibodies, http://www.cbbsweb. org/cbgarrattyaiha.html.

GHILARDI, F. et al. "Análise clínica laboratorial na sensibilização eritrocitária perinatal com a realização de estudo imuno-hematológico pela gel-centrifugação", em *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 17 (170), 1995.

GLASS, R. I. *et al.* "Predisposition for Cholera of Individuals with O Blood Group: Possible Evolutionary Significance", em *Am. J. Epidemiol.*, 121 (6), 1985.

HARMENING, D. *Modern Blood Banking Transfusion Practices*. Filadélfia: F. A. Davis Company, 1989.

HSU, T. C. S. *et al.* "IgG-coated in ABO Incompatible Babies", em *Vox Sanguinis*, nº 26, 1974.

HUMBERT, J. & WARCKER, P. "Common Anemias in Neonatology", em *Schweiz Rundsch Med Prax*, 88 (5), 1999.

HUSTINIX, H. *et al.* "Evolution of Gel Test and Comparation with Other Antiglobulin Techniques", em *Simposio of New Techniques in Blood Grouping Serology*, 1990.

ISSIT, P. D. & Anstee, D. J. *Applied Blood Group Serology*. 4ª ed. Durham: Montgomery Scientific, 1999.

KIRKMAN, N. N. "Further Evidence for a Racial Difference in Frequency of ABO Hemolytic Disease", em *J. Pediatr.*, nº 90, 1977.

LA PIERRE, Y. *et al. The Gel Test: A New Way to Detect Red Cells Ag-Ab Reactions*. Lion: Centre de Transfusion Sanguine, 1989.

LEGER, R. M. & GARRATTY, G. "Evaluation of Methods for Detecting Alloantibodies Underlying Warm Autoantibodies", em *Transfusion*, nº 37, 1997 (Abstract); *Transfusion*, nº 39, 1999.

LIEW, Y. W. & DUCAN, N. "Polyethilene Glycol in Autoadsorption of Serum for Detection of Alloantibodies", em *Transfusion*, nº 35, 1995.

MCDONNELL, M. *et al.* "Hydrops Fetalis Due to ABO Incompatibility", em *Dis Child Fetal Neonatal*, nº 78, 1998.

MERRY, A. H. *et al.* "Quantitation of IgG on Erytrocites: Correlation of Number of IgG Molecules per Cell with the Strenght of Direct and Indirect Antiglobulin Tests", em *Vox Sanguinis*, 47 (1), 1984.

MIURA, E. *Neonatologia: princípios e prática*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1991.

MOLLISON, P. L. *et al. Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 8ª ed. Londres: Blackwell Scientific, 1987; 9ª ed., 1993 e 10ª ed., 1997.

MORAN, A. P. "Pathogenesis of *Helicobacter Pylori*", em *Current Opinion in Gastroenterology*, nº 14, Supplement 1, 1998.

NATHALANG, O. "Comparison between the Conventional Tube Technique and the Gel Technique in Direct Antiglobulin Tests", em *Vox Sanguinis*, nº 72, 1997.

NOVARETTI, M. C. Z. Curso de imuno-hematologia avançada. São Paulo: Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, 1998.

_____. *Sistema de Grupo Sanguíneo Rh. Hematologia e Hemoterapia*. São Paulo: Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, 1997.

PEEVY, K. J. & WISEMAN, H. J. "ABO Hemolytic Disease of the Newborn: Evaluation of Management and Identification of Racial and Antigenic Factors", em *J. Pediatr.*, nº 61, 1978.

PETZ, L. D. *et al. Clinical Practice in Transfusion Medicine.* 3ª ed. Nova York: Churchill Livingstone, 1996.

POLLEY, M. *et al.* "A Simple Serological Test for Antibodies Causing ABO-Haemolytic Disease of the Newborn", em *The Lancet*, 1965.

POUBEL, S. M. R. *Avaliação das discrepâncias na tipagem ABO*, monografia. Niterói: UFF, 1996.

RIOS, M. & BIANCO C. "The Role of Blood Groups Antigens in Infectious Diseases", em *Seminars in Hematology*, 37 (2), abril de 2000.

_____ & CASTILHO, L. M. "Biologia molecular dos grupos sangüíneos e sua aplicação em medicina transfusional". Curso de aperfeiçoamento em biologia molecular. São Paulo. Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo, 1998.

ROITT, I. M. *Imunologia.* 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

ROMANO, E. L. *et al.* "Direct Antiglobulin Reaction in ABO-Haemolytic Disease of the Newborn", em *Brit. Med. J.*, 1973.

ROSENFIELD, R. E. "A-B Hemolytic Disease of the Newborn. Analysis of 1480 Cord Blood Specimens, with Special Reference to the Direct Antiglobulin Test and to the Group O Mother", em *Blood*, nº 10, 1955.

SANTOS, J. A. "Atualização em sistemas ABO e Rh". Curso de atualização em imuno-hematologia eritrocitária. São Paulo: Hospital Samaritano, 2000.

_____. Curso de atualização em inumo-hematologia eritrocitária. Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo/DiaMed Brasil, 1998.

_____. Curso de atualização em imuno-hematologia. Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo, 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA. *Imunohematologia eritrocitária: Sistema de Treinamento a Distância (STD).* Belo Horizonte: Instituto de Engenharia Aplicada (IEA), 1996.

_____. *Manual de treinamento a distância.* Belo Horizonte: IEA, 1996.

THE AMERICAN NATIONAL RED CROSS. *Immunohematology Methods and Procedures.* Rockville: The American National Red Cross, 1993.

PURVES, W. K. *Cells & Genes.* CD-ROM. Sunderland: The Mona Group LLC, 1998.

_____. *Get it Genetics.* CD-ROM. Sunderland: The Mona Group LLC, 1998.

TISSOT, J. D. *et al.* "The Direct Antiglobulin Test: Still a Place for the Tube Technique?", em *Vox Sanguinis*, nº 77, 1999.

VERLENGIA, R. & COSTA, C. *Fundamentos em biologia molecular aplicada ao diagnóstico laboratorial*. Curso de aperfeiçoamento em biologia molecular. Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo, 2000.

VERRASTRO, T. *et al. Hematologia e hemoterapia*. São Paulo: Atheneu, 1996.

VOAK, D. E. & BOWLEY, C. C. "A Detailed Serological Study on the Prediction and Diagnosis of ABO Haemolytic Disease of Newborn (ABOHD)", em *Vox Sanguinis*, nº 17, 1969.

VOGEL, F. P. "Uber Die Populationsgenetik Der ABO Blutgruppen", em *Acta Genetica et Statistica Medica*, nº 10, 1960.

V.v.A.a. *Blood Group Antigen Gene Mutation Database*, http://www.bioc.aecom.yu.edu/bgmut/index.htm, 2001.

WENDEL, S. "Nomenclatura ISBT para antígenos eritrocitários", em *Manual de treinamento a distância*. Belo Horizonte: IEA, 1996.

YAMAMOTO, F. *Blood Group Antigen Gene Mutation Database*, http://www.bioc.aecom.yu.edu/bgmut/abo.htm.

_____ *et al.* "Molecular Genetic Bases of the Histo-Blood Group ABO System", em *Nature*, nº 345, 1990.

# Sobre as autoras

## Ana Lúcia Girello

Graduada em Biomedicina, pela Universidade Santo Amaro (Unisa), e em Publicidade, pela Escola Superior de Propaganda e Marketing (ESPM), em São Paulo. Atuou como Assessora Científica da DiaMed Latino-América/Ph7 Comércio e Representação, por cinco anos, no atendimento técnico a serviços de hemoterapia do estado de São Paulo. É mestranda em Análises Clínicas pela Unisa, na disciplina de Hematologia e Hemoterapia. Trabalha como docente-coordenadora do Curso técnico em hemoterapia e programas de aperfeiçoamento do Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo, onde atua há quatro anos. Trabalha, ainda, como consultora de *marketing* científico na empresa Bioline Distribuidora e Assessoria, com sede em Vinhedo, interior de São Paulo, e é especializada em treinamento empresarial para serviços de hemoterapia e laboratórios de análises clínicas, com clientes em todo o Brasil.

## Telma Ingrid Borges de Bellis Kühn

Graduada em Farmácia e Bioquímica pelas Faculdades Osvaldo Cruz, em São Paulo. Atuou por onze anos como biologista na Fundação Pró-San-

gue/Hemocentro de São Paulo e no Serviço de Hemoterapia da Real Benemérita Beneficência Portuguesa, em São Paulo. Tem especialização em Hematologia Laboratorial pela Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto. É docente do Curso técnico em hemoterapia e programas de aperfeiçoamento do Centro de Educação em Saúde do SENAC de São Paulo. Trabalha também como consultora de *marketing* científico na empresa Bioline Distribuidora e Assessoria, com sede em Vinhedo, interior de São Paulo, e é especializada em treinamento empresarial para serviços de hemoterapia e laboratórios de análises clínicas, com clientes em todo o Brasil.